

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Geneviève BRUNEL-CAPELLE

1^{re} THÈSE :

DECARBOXYLATION BIOLOGIQUE
DE L'ACIDE MESOXALIQUE ET CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU METABOLISME DES COMPOSES THIOLS
CHEZ LES VÉGÉTAUX

2^e THÈSE : Propositions données par la Faculté

soutenues le 24 Mai 1955, devant la Commission d'Examens :

MM. L. PLANTEFOL *Président*

C. FROMAGEOT
R. ULRICH } *Examineurs*

1955

DECARBOXYLATION BIOLOGIQUE

DE L'ACIDE MESOXALIQUE

ET

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU METABOLISME DES COMPOSES THIOLS

CHEZ LES VEGETAUX

Série 2759 A

N° d'ordre:
3632

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

de

L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

le grade de Docteur ès-Sciences Naturelles

par

Geneviève BRUNEL-CAPELLE

+++++

1^{ère} Thèse : DECARBOXYLATION BIOLOGIQUE DE L'ACIDE MESOXALIQUE ET CONTRIBUTION
A L'ETUDE DU METABOLISME DES COMPOSES THIOLS CHEZ LES VEGETAUX.

2^{ème} Thèse : Propositions données par la Faculté

Soutenues le :

devant la Commission d'examen

+++

MM. L. PLANTEFOL *Président*

C. FROMAGEOT }
R. ULRICH } *Examineurs*



FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

Doyen J. PERES

PROFESSEURS

JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure	LUCAS	T Physique
DENJOY	T Théorie des Fonctions	THOMAS	T Biologie Cellulaire
LUTAUD	T Géographie physique et Géologie dynamique	ARNULF	T Optique appliquée
DARMOIS	T Enseignement de Physique	MORAND	Physique
LEVY	T Physiologie comparée	SOLEILLET	T Physique
FOCH	T Mécanique physique et expérimentale	FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides
PAUTHENIER	T Electrotechnique générale	DANJON	T Astronomie
De BROGLIE	T Théories physiques	FROMAGEOT	T Chimie biologique
JOB	T Chimie générale	LAPORTE	T Physique générale et Radioactivité
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées	JANET	T Mécanique analytique et mécanique céleste
GARNIER	T Géométrie supérieure	PETIT	T Biologie maritime
PERES	T Mécanique des fluides et applications	QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique
LAUGIER	T Physiologie générale	GALLIEN	T Biologie animale (P.C.B.)
CURIE	T Physique (P.C.B.)	EICHHORN	T Biologie végétale (P.C.B.)
RIBAUD	T Hautes températures	De CUGNAC	Biologie végétale (P.C.B.)
CHAZY	T Mécanique analytique et Mécanique céleste	Mlle CAUCHOIS ..	T Chimie-Physique
CROZE	T Physique théorique et physique céleste.	THELLIER	T Physique du Globe.
DUPONT	T Théories chimiques	AUDUBERT	T Electrochimie.
VALIRON	T Calcul différentiel et calcul intégral	L'HERITIER	T Génétique.
BARRABE	T Géologie structurale et géologie appliquée	GRIVET	T Radio Electricité.
DARMOIS	T Calcul des probabilités et Physique mathématique.	PONCIN	T Mécanique des fluides.
BOURCART	T Géographie physique et géologie dynamique	THIRY	T Mécanique appliquée.
AUBEL	T Chimie biologique.	DUBREIL	T Mathématiques générales
Mme JOLIOT-CURIE.	T Physique générale et Radioactivité.	QUELET	T Chimie (P.C.B.).
PLANTEFOL	T Botanique.	CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
CABANNES'	T Recherches physiques.	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
GRASSE	T Evolution des êtres organisés.	CUVILLIER	T Géologie structurale et Géologie appliquée.
PREVOST	T Chimie organique.	JUNG	T Pétrographie.
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie.	TRILLAT	T Chimie physique.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	WIEMANN	T Chimie (P.C.B.).
WYART	T Minéralogie.	JACQUINOT	T Physique (P.C.B.).
TEISSIER	T Zoologie.	VASSY	Physique de l'atmosphère.
MANGENOT	T Biologie végétale.	DESTOUCHES	Théories physiques.
AUGER	T Physique quantique et relativité.	PRUVOST	T Géologie.
		AMIEL	T Chimie (P.C.B.).
		HOCART	T Minéralogie.
		MATHIEU	T Physique (P.C.B.).
		COUTEAUX	Biologie animale (P.C.B.).

MONNIER	Physiologie générale.	MAY	Biologie animale (P.C.B.).
PIVETEAU	T Géologie.	CHOQUET	T Calcul différentiel.
ROCARD	T Physique.	FELDMANN	Biologie (P.C.B.).
CARTAN	T Mathématiques (E.N.Supérieure)	GUINIER	T Physique (P.C.B.).
LAFFITTE	T Chimie générale.	JOST	T Biologie (P.C.B.).
FAVARD	T Mécanique générale.	SCHWARTZ	T Méthode Mathématique de la physique
COULOMB	T Physique du Globe.	MALAVARD	T Aviation.
Mlle COUSIN	T Biologie animale (P.C.B.).	BRELOT	T Calcul différentiel.
CHRETIEN	T Chimie minérale.	NORMANT	T Chimie (P.C.B.).
DRACH	T Zoologie.	BENARD	Chimie (P.C.B.).
KASTLER	T Physique.	BUVAT	Botanique (E.N.S.).
EPHRUSSI	T Génétique.	DUGUE	Statistique Mathématique.
WURMSER	T Biologie physico-chimique.	GELOSO	Chimie (P.C.B.).
BAUER	T Chimie-Physique.	MARECHAL	Optique Théorique et appliquée.
RIVIERE	T Géologie (P.C.B.).	SOULAIRAC ...	Psychophysiologie.
GAUTHERET	T Biologie végétale (P.C.B.).	ULRICH	Physiologie végétale.

Secrétaire : Ch. MONIER.

÷
÷ ÷
÷

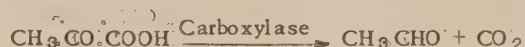
A MON MARI

A MES PARENTS

En témoignage de ma profonde affection

INTRODUCTION

Au début du siècle, NEUBERG et KARCZAG (125), confirmant une hypothèse de NEUBAUER et FROMHERZ (123), montrent que la levure de bière renferme un enzyme qui provoque la conversion de l'acide pyruvique en acétaldéhyde et anhydride carbonique.



Cette découverte fondamentale, qui mettait, pour la première fois, clairement en évidence l'existence des desmolases, est à l'origine des nombreux travaux qui ont permis de dégager l'importance des processus de décarboxylation et le rôle joué par les acides organiques chez les êtres vivants.

Parmi les acides organiques rencontrés chez les végétaux, les acides cétoniques se distinguent par leurs propriétés réactives exceptionnelles. Les mieux connus, en raison de leur large distribution ou de leur fonction physiologique importante, sont les acides pyruvique (C_3), oxalacétique (C_4), α -cétoglutarique (C_5) et oxalosuccinique (C_6). Ces acides entrent dans le cycle des acides tricarboxyliques de KREBS, cycle dont l'intervention dans les processus de la respiration chez les végétaux supérieurs, a été précisée par les recherches de MILLERD, BONNER, AXELROD et BANDURSKI (116) à la suite de l'obtention, à partir de *Phaseolus aureus*, d'une préparation qui catalyse l'oxydation de tous les membres du cycle.

L'acide pyruvique occupe une « position clé » dans le métabolisme cellulaire. Il est le produit obligatoire de la scission des hexoses-phosphates au cours du processus anoxybiontique de la fermentation et il intervient dans les phénomènes oxybiontiques de la respiration qui conduisent la dégradation de la chaîne carbonée des métabolites jusqu'à ses termes ultimes : anhydride carbonique et eau. Le rôle joué par l'acide pyruvique n'est pas moins important dans les réactions anaboliques : lipogénèse, protéogénèse et aussi synthèse de la liaison C-C : WOOD et WERKMAN (175, 170) ont montré, en effet, que chez les bactéries hétérotrophes, cet acide pouvait être carboxylé et conduire à l'acide oxalacétique. La carboxylation de l'acide pyruvique a été aussi signalée chez les végétaux supérieurs (65, 43) ; ici, la réaction serait catalysée par un système enzymatique où interviendrait l'enzyme malique décrit initialement par OCHOA (130) chez les animaux.

En dehors des acides cétoniques intervenant dans le cycle de KREBS, se rencontrent d'autres

cétoacides, dont le métabolisme reste imprécis ou est inconnu. Pour certains, acides α -acétolactique (168, 89) et acétylacétique (47), il existe des enzymes décarboxylants spécifiques; il n'en est pas de même pour l'acide acétone-dicarboxylique, composé dont l'importance biologique est encore douteuse, bien qu'il prenne naissance par décarboxylation oxydative de l'acide citrique, sous l'influence du mycélium de l'*Aspergillus niger* (38).

Par ailleurs, certains de ces acides sont supposés apparaître, à titre transitoire, au cours de la photosynthèse (35, 14): acides oxalacétique, cétomalique, dicéto succinique, etc. L'acide dicéto succinique pourrait avoir pour origine l'acide dihydroxymaléique, KUZIN et DOMAN (99) ayant montré que ce dernier acide infiltré dans les feuilles de *Tradescantia* est rapidement oxydé en acide dicéto succinique. Un rôle possible est également attribué par WETZEL et RUHLAND (172) à l'acide dicéto adipique dans la formation des acides organiques des feuilles des plantes succulentes. Enfin, l'acide mésoxalique aurait été rencontré chez *Medicago sativa* (53), *Soja hispida* (148), et *Beta vulgaris var. Rapa* (107); on ne possède aucune donnée sur son rôle physiologique.

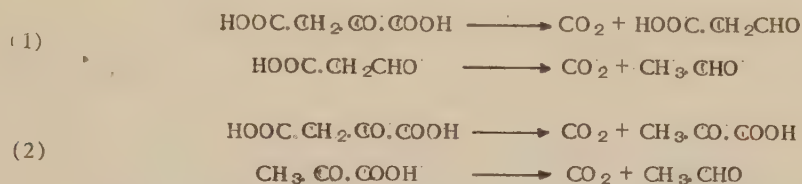
Le métabolisme des cétoacides est donc sous la dépendance de catalyseurs, le plus souvent, de bicatalyseurs, qui permettent la réalisation de très nombreuses transformations: décarboxylations simples et oxydatives, carboxylations, oxydo-réductions, condensations, dismutations. Ici, nous n'envisagerons que les données se rapportant à la décarboxylation simple des acides α -cétoniques, notre travail s'y rattachant plus particulièrement.

Les cétoacides sont redevables de deux groupes d'enzymes, les α et les β -cétoacides carboxylases⁽¹⁾. Les α -cétoacides-carboxylases requièrent, pour leur activité, la diphosphothiamine et, quelquefois, un ion métallique, l'ion Mg^{++} par exemple (5, 109, 98). La carboxylase pyruvique ou carboxylase de NEUBERG, la mieux connue du groupe est essentiellement un enzyme des végétaux (124, 82, 33, 161, 39, 165, 112). Elle libère directement à partir de l'acide pyruvique de l'anhydride carbonique à l'état libre (96) et non sous forme hydratée comme CONWAY et MacDONNELL l'avaient pensé (45) et, jusqu'ici, il n'existe aucune preuve convaincante que son action soit réversible (36). L'enzyme qui est fortement activé par la cystéine (34), s'attaque d'une façon générale aux acides possédant, dans leur molécule, un groupe carbonyle en position α , par rapport au carboxyle. Cette propriété, signalée dès 1911 par NEUBERG et son école (124) a été confirmée par WETZEL (171), KOBAYASI (91), GREEN, HERBERT et SUBRAHMANYAN (67). Des travaux de ces auteurs, se dégagent deux notions essentielles:

- la possibilité pour un α -cétoacide de servir de substrat à la carboxylase diminue, à mesure que la longueur de la chaîne carbonée augmente,
- L'introduction d'un groupe phényle ou hydroxyphényle dans la molécule du substrat rend ce dernier inattaquable par l'enzyme ou diminue considérablement la vitesse de décarboxylation.

(1) Les processus de décarboxylation étant, en principe, réversibles, nous avons adopté le terme «carboxylase» précédé ou suivi du nom du substrat spécifique, pour désigner tout enzyme catalysant la libération d'anhydride carbonique à partir des cétoacides, réservant avec VENNESLAND (164) le terme plus restrictif de «décarboxylase» au cas particulier des enzymes s'attaquant aux amino-acides.

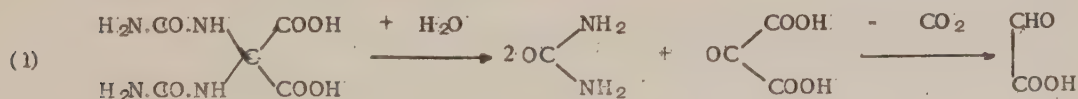
Le comportement de certains α -cétoacides vis-à-vis de la carboxylase pyruvique, mérite d'être considéré séparément; c'est le cas des acides oxalacétique et mésoxalique. L'acide oxalacétique, à la fois α - et β -cétoacide, est décarboxylé par l'enzyme de NEUBERG et donne une molécule d'acétaldéhyde et deux molécules d'anhydride carbonique. Le mécanisme de la décarboxylation, qui a été longuement discuté (110, 91, 170, 165, 163), peut s'envisager de deux façons, suivant que l'on admet la formation intermédiaire de la semialdéhyde malonique (réactions 1) ou de l'acide pyruvique (réactions 2).



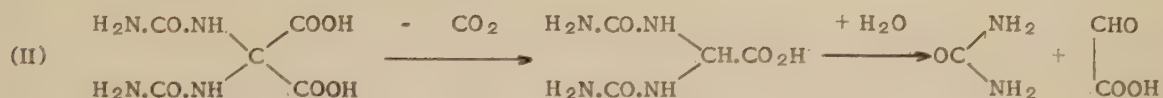
Actuellement, il semble avec VENNESLAND (164) que le mécanisme proposé en (2) soit le plus vraisemblable, le carboxylase pyruvique n'intervenant que secondairement. La formation de l'acide pyruvique, à partir de l'acide oxalacétique est d'ailleurs facile; en effet, ce dernier acide, comme tous les β -cétoacides, est instable en solution aqueuse, où il subit spontanément la β -décarboxylation avec une vitesse qui est fonction du pH du milieu (95). La réaction est catalysée par certains cations (Mn^{++} , Mg^{++} , ...), par les composés à fonction amine, y compris l'aniline, les acides aminés, les protéines (95, 94, 93, 145, 128). Des suspensions de tissus portées à l'ébullition catalysant aussi la décarboxylation, l'existence d'une oxalacétique- β -carboxylase est restée longtemps douteuse, bien que KRAMPITZ et WERKMAN (94) aient montré que *Micrococcus leio-* *deikticus* possède un enzyme thermolabile catalysant la décomposition de l'acide oxalacétique. L'isolement de l'enzyme par VENNESLAND (163, 166) est venu confirmer l'existence du catalyseur.

L'acide mésoxalique, α -cétodiacide, dont la décarboxylation a été étudiée par WETZEL (171), présente une remarquable stabilité vis-à-vis de la carboxylase de la levure ou de *Lupinus albus*; c'est encore un inhibiteur puissant de la décarboxylation de l'acide pyruvique. L'acide mésoxalique serait donc un exemple type d'un α -cétoacide à chaîne courte qui ne serait pas redevable de la carboxylase de NEUBERG. Cependant, dans un travail sur l'utilisation des uréides par le *Sterigmatocystis nigra*, BRUNEL (24) a signalé que le mycélium de ce champignon obtenu avec le diuréide mésoxalique (acide uroxanique) comme source d'azote, possédait la propriété de dégrader l'uréide, pour donner, *in fine*, de l'ammoniaque et de l'acide glyoxylique. La formation d'acide glyoxylique ne peut s'expliquer que si une réaction de décarboxylation intervient au cours du processus. On peut avoir :

Hydrolyse de l'acide uroxanique, suivie d'une décarboxylation de l'acide mésoxalique formé.

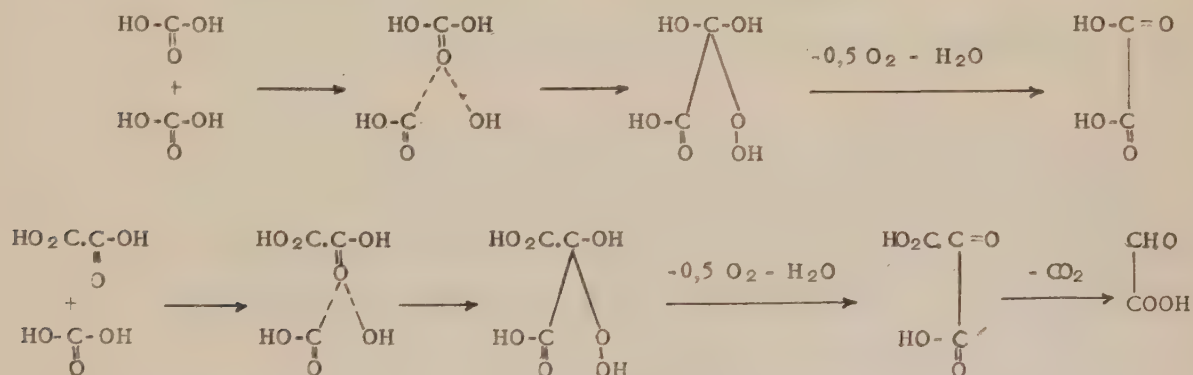


Décarboxylation de l'acide urocanique, suivie d'une hydrolyse en urée et acide glyoxylique de l'acide allantoïque formé,



La présence dans le mycélium d'un catalyseur biochimique capable, dans la zone acide des pH, de provoquer la décarboxylation de l'acide mésoxalique, incline à penser que le mécanisme (I) est prédominant; la facilité avec laquelle l'acide urocanique se scinde en urée et acide mésoxalique en milieu acide en est encore une confirmation.

Selon une intéressante hypothèse émise en 1925 par TSCHELINZEFF (159), l'acide mésoxalique pourrait apparaître lors de la photosynthèse. Il y aurait, au cours du processus, formation de peroxydes par mise en jeu des valences supérieures de l'oxygène carbonyle, la décomposition de ces peroxydes conduisant à l'acide glycérique avec, comme composés intermédiaires, les acides oxalique, mésoxalique, glyoxylique tartronique, glycolique, ...



Remarquons, qu'en application du principe de la condensation carbonyle, l'acide mésoxalique pourrait aussi réagir directement avec l'acide carbonique pour donner l'acide dioxytartrique composé en C₄, dont on a envisagé l'intervention éventuelle dans la photosynthèse (35). Le schéma de TSCHELINZEFF fait encore ressortir la labilité de l'acide mésoxalique, lequel, par décarboxylation partielle, conduit à l'acide glyoxylique, acide aldéhyde dont l'importance physiologique se précise de plus en plus (92, 31, 177, 176, 158, 157).

Nos connaissances actuelles sur l'acide mésoxalique peuvent donc se résumer ainsi: cet α-cétodiacide n'est pas un substrat pour la carboxylase de NEUBERG, il est cependant décarboxylé par le mycélium du *Sterigmatocystis nigra* et, suivant les considérations théoriques de TSCHELINZEFF, il pourrait se former lors

du processus photosynthétique .

Nous nous sommes proposée, dans ce travail, de reprendre le problème de la décarboxylation de l'acide mésoxalique . Dans une première partie, nous exposerons les recherches qui nous ont permis :

- De montrer que la levure est capable de décarboxyler l'acide mésoxalique ,
- De dégager le mécanisme du processus qui fait intervenir un système catalytique agissant par l'intermédiaire de la fonction thiol.

Cette étude fait ressortir une propriété, jusqu'alors inconnue, du groupe thiol : celle de catalyseur de décarboxylation . Elle fournit encore l'exemple d'un modèle de carboxylase différent de celui décrit par LANGENBECK .

Dans une seconde partie, essentiellement physiologique, envisageant le problème sous un aspect différent et regardant l'acide mésoxalique comme un réactif des groupes thiols, nous avons cherché à suivre les variations du métabolisme des composés sulphydrylés . Dans ce but, nous avons étudié la répartition du catalyseur de décarboxylation chez les végétaux, son évolution au cours de la germination, sa localisation et ses relations avec le métabolisme général de la plante .

Le présent travail comprend les chapitres suivants :

PARTIE BIOCHIMIQUE

- I - Substrats, préparation, propriétés et déterminations quantitatives,
- II - Présence, chez *Saccharomyces cerevisiae*, d'un catalyseur de décarboxylation de l'acide mésoxalique.
- III - Conditions expérimentales de la décarboxylation de l'acide mésoxalique .
- IV - Nature du groupe actif du catalyseur de décarboxylation et hypothèse sur le mécanisme d'action,
- V - Comportement du glutathion et de quelques thiols-protéines vis-à-vis de l'acide mésoxalique.
- VI - Conclusions se rapportant aux recherches d'ordre biochimique.

PARTIE PHYSIOLOGIQUE

- I - Définition d'une unité d'activité et d'une valeur mésoxalique . Détermination de l'activité mésoxalique.
- II - Aperçu sur les propriétés décarboxylantes des végétaux vis-à-vis de l'acide mésoxalique.
- III - Evolution des propriétés décarboxylantes au cours de la germination.
- IV - Propriétés décarboxylantes de végétaux se développant dans leur milieu naturel.
- V - Propriétés décarboxylantes des feuilles panachées et achlorophylliennes.
- VI - Etude comparée des propriétés décarboxylantes d'espèces appartenant à diverses familles .
- VII - Conclusions se rapportant aux recherches d'ordre physiologique.

CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail a été effectué aux Laboratoires de Botanique de l'Ecole Supérieure des Sciences de Saïgon et de la Faculté des Sciences de Rennes .

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, nous ne saurions oublier toutes les facilités de travail qui nous ont été accordées lors de notre séjour en Indochine par M. le Recteur d'Académie M. BAYEN , Directeur-Adjoint de l'Enseignement Supérieur . Qu'il nous soit permis de lui adresser nos sincères et respectueux remerciements .

Nous prions M. le Professeur L. PLANTEFOL , qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre thèse, de trouver ici l'expression de notre gratitude pour la bienveillance et l'intérêt qu'il nous a toujours témoignés . Nous exprimons notre vive reconnaissance à M. le Professeur C. FROMAGEOT pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire et pour les conseils précieux qu'il a bien voulu nous donner. Nous présentons à M. le Professeur ULRICH nos remerciements pour toute sa sollicitude et nous tenons à l'assurer de nos sentiments très reconnaissants.

Nous ne voulons pas terminer sans témoigner notre sympathie à M. P. SOUCHAY, Maître de Conférences à la Sorbonne et à M. H. LE MOAL, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Rennes , qui ont bien voulu s'intéresser à notre travail, et sans remercier M. le Professeur M. SCHMITT , Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Nantes , qui nous a donné très amicalement la possibilité de faire imprimer ce mémoire .

÷
÷ ÷
÷

PARTIE BIOCHIMIQUE

CHAPITRE I

SUBSTRATS

PREPARATION, PROPRIETES ET DETERMINATIONS QUANTITATIVES

	<i>Pages</i>
<i>A - ACIDE MESOXALIQUE</i>	9
1 - Préparation	9
2 - Propriétés	10
3 - Détermination quantitative	11
a - Par colorimétrie absolue de l'acide glyoxylique engendré par décarboxylation	11
b - Par mesure manométrique de l'anhydride carbonique dégagé	17
 <i>B - ACIDE GLYOXYLIQUE</i>	 17
1 - Préparation	17
2 - Propriétés	17
3 - Détermination quantitative	18

SUBSTRATS

PREPARATION , PROPRIETES ET DETERMINATIONS QUANTITATIVES

A - ACIDE MESOXALIQUE

I - PREPARATION -

Nous avons retenu, pour nos essais, le sel desodium (44, 12), de préférence au sel de baryum, le premier se préparant facilement à partir de l'acide dibromomalonique et avec un bon rendement .

Préparation de l'acide dibromomalonique .



Dans un erlenmeyer, on introduit 20,8 g. (0,2 mol.) d'acide malonique et 20 ml d'acide chlorhydrique normal , puis, à l'aide d'une burette, on verse goutte à goutte dans le mélange fortement refroidi par la glace, 21,3 ml. de brome, soit 64g. A chaque addition et après agitation, on vérifie que le brome a bien disparu. Dans le cas contraire, on retire l'erlenmeyer du mélange réfrigérant afin de réchauffer un peu la masse et on agite jusqu'à disparition de l'halogène . On refroidit à nouveau et on reprend l'addition du brome . La dissolution totale de l'acide malonique s'obtient lorsque la moitié du brome a été ajoutée et l'addition du reste du brome fait apparaître l'acide dibromomalonique qui cristallise . On l'essore à fond sur creuset G₄ et on le sèche dans le vide sur chaux-sodée jusqu'à disparition totale de l'acide bromhydrique. Rdt. 44g., Th. 52g.

Obtention du mésoxalate de sodium C₃H₂O₆Na₂, PM: 180,04



Dans une solution glacée de 27 g. de soude pure dans 75 ml d'eau distillée, on introduit par petites portions en agitant, 39 g. d'acide dibromé, on filtre sur amiante ou mieux sur creuset G₄, puis on porte la solution au bain-marie bouillant pendant 3 heures : le mésoxalate de sodium cristallise . On refroidit le mélange par la glace , on essore à fond sur creuset G₄ et on lave trois fois avec le minimum d'eau distillée glacée . On reprend la masse dans un bécber avec de l'acide acétique au 1/4 glacé en quantité suffisante pour neutraliser la soude qui reste . On essore à nouveau sur creuset en verre fritté et on lave trois fois à fond avec peu d'eau distillée glacée, afin d'éliminer l'excès d'acide acétique et l'acétate de sodium . On dissout le sel ainsi obtenu dans le minimum d'eau bouillante , on filtre, on abandonne à la glacière, puis, après refroidissement, on ajoute de l'alcool à 96° , de façon à faciliter la cristallisation . On recueille le sel de sodium sur creuset G₄, on essore à fond, on lave avec un peu d'alcool, on sèche à l'étuve à 80-90° et on vérifie la pureté du méso-

xalate par semimicrodosage du sodium à l'état de sulfate . Le mésoxalate cristallise avec une molécule d'eau .

Rdt. 15 g. environ, soit 55% de la théorie .

Analyse.- Mat. 24,62 mg , SO_4Na_2 : 19,39 mg , pour $\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_6\text{Na}_2$: Na% Th. 25,56 ; Tr. 25,52.

2 - PROPRIETES -

L'acide libre se présente sous la forme de cristaux blancs se ramollissant vers 110° et fondant entièrement à 120° . Il est soluble dans l'eau, l'alcool et l'éther . Il réduit à chaud le nitrate d'argent ammoniacal avec dégagement d'anhydride carbonique . En solution aqueuse concentrée, le cétodiacide se décompose par chauffage : il apparaît de l'acide glyoxylique avec dégagement d'anhydride carbonique .

En solution aqueuse ou faiblement acide, il donne, avec le chlorhydrate de phénylhydrazine, une phénylhydrazone peu soluble : $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH.N}=\text{C}(\text{COOH})_2$, fondant à 160-164° . Le sel de sodium est bien cristallisé ; 100 p. d'eau à 23° dissolvent 4,2 p. du sel anhydre . Le sel de baryum $\text{Ba}(\text{COO})_2\cdot\text{CO}_2\text{H}_2\text{O}$, très peu soluble dans l'eau, se prépare à partir de l'alloxane . Dans une solution de 5g. d'alloxane dans 25 ml d'eau distillée, on verse en filtrant 100 ml d'eau distillée portée à 60° et renfermant 10 g. d'hydrate de baryum . On agite et on laisse cristalliser à la glacière l'alloxanate de baryum . On reprend le sel par l'eau froide, on porte le mélange à l'ébullition, il se forme de l'urée et le mésoxalate de baryum précipite . On le recueille sur filtre en verre fritté, on le lave plusieurs fois à l'eau glacée et on le sèche à l'étuve à 80-90° .

Note : En milieu acide, l'acide mésoxalique peut être dosé volumétriquement par le permanganate ; l'équation de la réaction :



permet de calculer que 1 ml. de permanganate N/50 correspond à 0,9 mg de mésoxalate de sodium ou à 0,68 mg. d'acide mésoxalique .

Mode opératoire : Solution de mésoxalate : 5 ml , acide sulfurique à 75 % : 2 ml., eau distillée : 3 ml. température : 60-65° . On fait tomber dans la solution la liqueur de permanganate contenue dans une burette au 1/20^{ème}, lentement au début, plus rapidement ensuite, en agitant constamment avec un thermomètre qui permet en même temps de connaître la température du milieu réactionnel, jusqu'à coloration rose persistante . Cette méthode facile n'est malheureusement pas applicable aux milieux renfermant de l'acide glyoxylique à côté d'acide mésoxalique l'acide glyoxylique se comportant vis à vis du permanganate comme l'acide mésoxalique, ainsi que le montrent les équations ci-après :



3 - DETERMINATION QUANTITATIVE

Par décarboxylation partielle, l'acide mésoxalique conduit à la formation d'une molécule d'anhydride carbonique et d'une molécule d'acide glyoxylique :



La détermination quantitative peut donc être basée, soit sur le dosage de l'acide glyoxylique engendré, soit sur la mesure du volume d'anhydride carbonique dégagé.

Remarque : Ne disposant pas au début de cette étude d'un appareil de WARBURG pour la mesure manométrique de l'anhydride carbonique engendré, nous avons établi les conditions du dosage de l'acide glyoxylique en présence d'acide mésoxalique. Au préalable, nous avons pris soin de vérifier, par la méthode classique à la baryte, que la réaction conduisait à la formation d'anhydride carbonique et que la décarboxylation s'arrêtait au stade de l'acide glyoxylique ; en effet, nous n'avons pu constater par la réaction au β -naphthol (voir page 18), l'existence d'aldéhyde formique dans le milieu. Par la suite, nous nous sommes assurée, en utilisant simultanément la méthode à l'acide glyoxylique et celle de WARBURG, qu'il se formait bien dans les conditions d'action du catalyseur, définies page 47, des quantités stœchiométriques d'acide glyoxylique et d'anhydride carbonique.

Au cours de ce travail, nous avons principalement retenu la technique basée sur le dosage colorimétrique de l'acide glyoxylique, en raison de sa sensibilité supérieure à celle de la mesure manométrique de l'anhydride carbonique. (voir page 48).

a - Par colorimétrie absolue de l'acide glyoxylique engendré par décarboxylation. -

Le dosage repose sur la mesure de l'intensité de la coloration rouge que donne cet acide avec le réactif de SCHRYVER-FOSSE (chlorhydrate de phénylhydrazine, ferricyanure de potassium, acide chlorhydrique concentré). L'acide glyoxylique est condensé en milieu acide avec le chlorhydrate de phénylhydrazine, la phénylhydrazone qui prend naissance est oxydée par le ferricyanure (ou un autre oxydant) en milieu chlorhydrique concentré (I).

Cette méthode a été appliquée par R. FOSSE et son école (56) à l'étude du métabolisme des uréides glyoxyliques et de l'acide urique et par nous, au cours de recherches sur les processus de dégradation de l'acide glyoxylique chez les êtres vivants (28). La technique décrite par les auteurs ne peut être utilisée avec succès pour le dosage de l'acide glyoxylique engendré par décarboxylation de l'acide mésoxalique, si ce dernier acide est présent dans le milieu, comme c'est le cas, en général, dans nos essais. En effet, en opérant comme le préconisent R. FOSSE, A. BRUNEL et P.E. THOMAS (57) (réaction effectuée en milieu chlorhydrique N/100 et en portant 2 minutes au bain-marie bouillant) l'acide mésoxalique se décarboxyle partiellement. En milieu acide, à la température ordinaire ou au bain-marie à 38-45°, on ne constate pas de décarboxylation de l'acide mésoxalique ou de son sel de sodium. Cependant, nous n'avons pu retenir ces conditions opératoires pour le dosage de l'acide glyoxylique simultanément présent, car la condensation avec la phénylhydrazine est incomplète et la réaction infidèle. On se trouve

(I) ARCHIBALD a décrit une nouvelle méthode de dosage reposant sur l'emploi de la diacétylmonoxime (3)

donc dans l'obligation d'opérer à la température du bain-marie bouillant et en l'absence d'acide chlorhydrique : la température de l'ébullition et en l'absence d'acide chlorhydrique, on note un comportement différent de l'acide mésoxalique et de son sel : décarboxylation nette dans le cas de l'acide libre . Nous avons étudié l'importance relative de la décarboxylation de l'acide et de son sel de sodium pris à des concentrations moléculaires variables le mode opératoire suivi est celui décrit pour le dosage de l'acide glyoxylique page 13 .

Acide mésoxalique -

L'acide mésoxalique libre a été obtenu en ajoutant au sel de sodium, la quantité théorique d'acide chlorhydrique normal. Le tableau I résume les résultats obtenus .

TABLEAU I
Acide mésoxalique libre

N° des solutions	Acide glyoxylique formé par litre (en mg.)	Acide mésoxalique par litre		Acide mésoxalique transformé en acide glyoxylique %
		préexistant (en mg.)	détruit (en mg)	
1	0,84	272 (M/ 500)	1,54	0,57
2	0,54	217,6 (M/ 625)	0,99	0,46
3	0,24	136 (M/ 1000)	0,44	0,32

A la température du bain-marie bouillant, on constate une décarboxylation faible de l'acide mésoxalique libre, avec formation d'acide glyoxylique , et l'importance de cette décarboxylation est fonction de la teneur en acide mésoxalique de la solution. On ne peut donc envisager de déterminer quantitativement l'acide glyoxylique en présence du kétodiacide libre .

Mésoxalate de sodium -

Le tableau 2 résume les résultats obtenus .

TABLEAU 2
Mésoxalate de sodium

N° des solutions	Acide glyoxylique formé par litre (en mg.)	Mésoxalate de sodium par litre		Mésoxalate de sodium transformé en acide glyoxylique %
		préexistant (en mg.)	détruit (en mg.)	
1	-	360 (M/ 500)	-	-
2	0,16	288 (M/ 625)	0,39	0,13
3	0,09	180 (M/ 1000)	0,21	0,12
4	0,04	90 (M/ 2000)	0,10	0,11

Après deux minutes au bain-marie bouillant, la solution I est colorée en jaune ; l'addition de l'acide chlorhydrique concentré et du ferricyanure provoque un léger trouble (phénylhydrazone mésoxalique) et la mesure à l'électrophotomètre n'est pas possible . Pour les concentrations supérieures à M/ 500 , la précipitation de la phénylhydrazone est immédiate dès l'addition de l'acide chlorhydrique .

A la température du bain-marie bouillant, les solutions de mésoxalate de sodium sont plus stables que celles de l'acide libre; les décarboxylations observées sont pratiquement négligeables et, dans les limites de concentrations des solutions essayées (M/ 625 à M/ 2000) , les pourcentages de transformation sont constants et de l'ordre de 0,12 % . Le dosage de l'acide glyoxylique, en présence d'acide mésoxalique, est donc possible en milieu neutre . En conséquence, il sera nécessaire, avant d'effectuer le dosage électrophotométrique, de déterminer, sur une prise d'essai séparée, la quantité de soude à ajouter pour se trouver en milieu neutre (virage au vert franc de l'indicateur de TASHIRO) . La concentration en mésoxalate de la solution à doser devra toujours être $\leq$ à M/ 625.

α - Tracé de la courbe d'absorption de l'acide glyoxylique en milieu neutre. Les mesures d'absorption ont été effectuées à l'électrophotomètre de MEUNIER avec l'écran vert ($\lambda = 49m\mu$) en utilisant une cuve de 1cm. d'épaisseur . Le glyoxylate de calcium a été retenu comme sel de référence .

1° - Préparation des solutions de glyoxylate - 222, 168g. de glyoxylate de calcium , $(OCH.COO)_2Ca, 2H_2O$, correspondent à 148,072 g. d'acide glyoxylique anhydre . A partir d'une première solution mère de glyoxylate à 15,64 mg. par litre d'eau distillée (correspondant à 10,42mg. d'acide anhydre par litre) on prépare, par dilution, des solutions à 0 , 521-1,042-2,084 et 3,150 mg. d'acide par litre . Les solutions étalons de titres intermédiaires 0,820-1,640 et 2,460 mg. par litre, ont été obtenues de la même manière à partir d'une nouvelle prise d'essai de glyoxylate pur .

2° - Réactifs (voir aussi remarques) . - Solutions fraîchement préparées et filtrées de :

Chlorhydrate de phénylhydrazine pur à 4 % dans l'eau distillée,
Ferricyanure de potassium à 10 % dans l'eau distillée .

3° - Mode opératoire - Essai principal . Dans un tube à essai en pyrex de 18 cm × 18 mm. , parfaitement propre et sec, on introduit avec précaution 2 ml. de la solution étalon mesurée à la pipette de précision. On ajoute 0,1 ml (2 gouttes) de solution de chlorhydrate de phénylhydrazine et on porte le tube 2 minutes au bain-marie bouillant . On refroidit ensuite dans un mélange eau-glacé ($T < 5^{\circ}$) pendant une minute, on ajoute à la microburette 1,2 ml. d'acide chlorhydrique pur ($d = 1,19$, exempt de fer), on agite jusqu'à ce que le contenu du tube soit homogène, puis on introduit 0,1 ml. (2 gouttes) de solution de ferricyanure de potassium. On agite à nouveau et on mesure l'absorption à l'électrophotomètre après une minute environ (temps compté dès l'addition du ferricyanure) .

La liqueur, la solution de chlorhydrate de phénylhydrazine et celle de ferricyanure de potassium , doivent être introduites , en ayant soin de ne pas en répandre sur la paroi du tube. Pour cela, on prélève la liqueur, on essuie extérieurement la pipette avec du papier Joseph, on amène au trait de jauge supérieur, on introduit la pipette dans le tube à essai, on fait toucher la pointe à la paroi du tube à 3 cm. du fond environ et on laisse couler les 2 ml. Pour les réactifs, on les fera tomber directement dans la liqueur .

Essai à blanc - On opère dans des conditions identiques, mais en remplaçant les 0,1 ml. de solution de chlorhydrate de phénylhydrazine par 0,1 ml. d'eau .

4° - Résultats - Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 3 .

TABLEAU 3

Acide glyoxylique en mg. par litre	Lectures à l'électrophotomètre			Moyenne	Valeur de l'absorption compte tenu de l'essai à blanc et de la surcharge H_1	Erreur moyenne
	1 ^{ère} mesure	2 ^{ème} mesure	3 ^{ème} mesure			
0,521	58,5- 58,7	58,2- 58,9	58,0- 58,5	58,5	29,5	0,33
0,820	80,0- 79,8	79,5- 79,1	79,2- 79,4	79,5	50,0	0,35
1,042	90,5- 90,5	91,0- 90,5	90,2- 90,4	90,5	61,5	0,26
1,640	130,5-130,0	130,0- 129,5	129,5- 130,5	130,0	100,5	0,44
2,084	156,2- 156,5	155,5- 155,8	156,0- 156,2	156,0	127,0	0,35
2,460	44,0- 44,5	44,5- 45,2	44,2- 44,8	44,5	150,0	0,42
3,150	89,2- 89,5	89,0- 88,5	88,8- 89,2	89,0	194,5	0,35

La courbe tracée avec les résultats ci-dessus est une droite et le calcul de l'erreur moyenne , sur un résultat pris isolément, montre qu'elle est utilisable avec une précision sensiblement identique sur toute son étendue .

5° - Remarques - Nous utilisons une solution de chlorhydrate de phénylhydrazine à 4 % et une solution de ferricyanure à 10 % , alors que la réaction colorée de l'acide glyoxylique s'effectue habituellement avec

des solutions respectivement à 1 et à 5 %. Nous avons été amenée à augmenter la concentration du réactif phénylhydrazinique, une partie de celui-ci réagissant avec le groupement cétonique de l'acide mésoxalique comme le montrent les essais qualitatifs suivants :

Dans une série de tubes à essai, on introduit 2 ml. d'une solution de mésoxalate M/100 ; on ajoute dans chaque tube, 0,1 ml. d'acide chlorhydrique N et des doses croissantes de solution de chlorhydrate de phénylhydrazine à 1 %, soit 0,1 - 0,15 - 0,20 - 0,25 - 0,30 - 0,35 - 0,40 ml. On porte deux minutes au bain-marie bouillant, on refroidit 1 minute, on ajoute 1,2 ml. d'acide chlorhydrique concentré, puis 0,1 ml. de solution de ferricyanure à 10 %. La phénylhydrazone mésoxalique commence déjà à précipiter dans le 2^{ème} essai pour une teneur en réactif de 0,15 ml. Par contre, la recherche de l'acide glyoxylique n'est positive qu'à partir du 5^{ème} essai pour une teneur en réactif égale à 0,3 ml. L'affinité du groupement cétonique de l'acide mésoxalique pour la phénylhydrazine se montre donc supérieure à celle du radical aldéhydique de l'acide glyoxylique engendré par décarboxylation ; ceci explique l'absence de réaction colorée dans les quatre premiers essais où la teneur en réactif est insuffisante. Pour assurer, en présence d'acide mésoxalique, une formation quantitative de l'hydrazone glyoxylique, afin d'obtenir, par la suite, la réaction colorée de SCHRYVER-FOSSE, il est nécessaire d'augmenter la concentration en réactif. Nous avons adopté la solution de chlorhydrate de phénylhydrazine à 4 % qui, dans nos essais, a donné des résultats satisfaisants.

En ce qui concerne le ferricyanure, nous avons constaté que l'utilisation d'une solution à 10 % conduit à une sensibilité maximum de la réaction ; l'emploi de solutions plus concentrées n'apporte aucune amélioration.

Enfin, la température présente une grande importance pour le développement de la réaction colorée. Il est nécessaire d'opérer au-dessous de 5° et, en conséquence, de refroidir dans l'eau glacée, avant d'ajouter l'acide chlorhydrique concentré, puis le ferricyanure. C'est seulement dans ces conditions que l'on obtient le maximum d'intensité et de stabilité ; pour des températures supérieures, l'erreur peut atteindre 10 à 20 %.

β - Substances pouvant apporter des causes d'erreurs dans le dosage de l'acide glyoxylique. - La réaction colorée phénylhydrazinique n'est pas étroitement spécifique de l'acide glyoxylique, elle est encore donnée à froid par l'aldéhyde formique, l'acide pyruvique et, après ébullition, par l'acide allantoïque et ses sels, les acides mésoxalique, uroxanique et acétique libres ⁽¹⁾. Par contre, le glyoxal, l'aldéhyde glycolique et le glycol purs, les mésoxalates, les uroxanates et les acétates ne réagissent pas avec le réactif de SCHRYVER-FOSSE.

Comme nous effectuons la réaction colorée en milieu neutre, la cause d'erreur qu'apporterait la présence éventuelle dans les solutions à doser, des acides mésoxalique, uroxanique ou acétique, n'est pas à retenir. Il ne reste à envisager que le cas de l'aldéhyde formique et des sels des acides pyruvique et allantoïque.

(1) - A cette liste, il faut ajouter l'acide dihydroxymaléique qui, instable en solution aqueuse, se transforme facilement en acide glyoxylique.

1° - Aldéhyde formique - Le formol développe avec le réactif hydrazinique, une coloration rouge intense (SCHRYVER) . Appliquée aux extraits végétaux, obtenus après défécation partielle du suc d'expression par ébullition, la réaction avait donné des résultats positifs dans de nombreux cas, permettant de conclure à la présence du formol dans les plantes et apportant ainsi une confirmation de l'hypothèse de BAYER-BOUSSINGAULT. Ultérieurement, FOSSE et HIEULLE (59) ont démontré que la réaction colorée observée devait être attribuée à l'acide glyoxylique provenant de l'hydrolyse, au cours des traitements, d'un uréide très répandu chez les végétaux : l'acide allantoïque .

La présence du formol à l'état libre chez les plantes n'a pu, jusqu'ici, être démontrée avec certitude (2) et nous pouvons éliminer cette cause d'erreur éventuelle . Il est d'ailleurs possible, en utilisant la réaction phénylhydrazinique, de distinguer le formol de l'acide glyoxylique : avec le formol, la réaction colorée est plus intense quand on procède à l'oxydation de la leucobase par le ferricyanure de potassium, avant d'ajouter l'acide chlorhydrique concentré ; c'est l'inverse pour l'acide glyoxylique . Il suffit donc d'effectuer la réaction colorée suivant les deux modes opératoires et de mesurer les absorptions correspondantes à l'électrophotomètre ,

2° - Acide pyruvique et ses sels - L'acide pyruvique (pyruvate de sodium Hoffmann-La Roche) qui possède une structure moléculaire voisine de celle de l'acide glyoxylique, réagit à froid comme à chaud avec le réactif de SCHRYVER-FOSSE . Pour des concentrations moléculaires égales, la coloration rouge est cependant beaucoup moins intense avec l'acide pyruvique , fait que l'on peut attribuer au groupe méthyle substituant qui diminue les possibilités réactives de l'acide . Pour nos essais nous avons retenu le pyruvate de sodium ; les réactions ont été effectuées dans les conditions habituelles (voir page 13) . Les résultats sont résumés dans le tableau 4 .

TABEAU 4

Teneurs en ac.pyruvique en mg. par litre	Phénylhydrazone pyruvique	Absorption à l'électrophotomètre
800	précipite	non mesurable
80	ne précipite pas	167
8	id.	26
4	id.	13
2	id.	4

La présence d'acide pyruvique peut donc apporter une cause d'erreur non négligeable dans le dosage de l'acide mésoxalique si les teneurs sont supérieures à 2mg. par litre, Remarquons, toutefois, que l'acide pyruvique libre est peu répandu chez les végétaux ; il a été signalé dans les écailles du bulbe de l'oignon (13,121) .

(2) - D'après KLEIN et TAUBOCK (90) les végétaux renfermeraient un uréide, le méthylènediuréide : $\text{CH}_2(\text{NH}.\text{CO}.\text{NH}_2)_2$, capable de libérer du formol par simple hydrolyse. A la lumière des travaux de FOSSE, cet uréide doit être identifié à l'acide allantoïque .

3° - Acide allantoïque et ses sels. - Comme l'acide allantoïque, les allantoates sont instables; ils s'hydrolysent facilement à l'ébullition pour donner de l'acide glyoxylique et de l'urée. Leur répartition chez les végétaux étant très large et les teneurs rencontrées souvent élevées, ils peuvent présenter une cause d'erreur importante dans le dosage de l'acide glyoxylique provenant de la décarboxylation de l'acide mésoxalique. Avant d'étudier les propriétés décarboxylantes d'un végétal, on procédera toujours à leur recherche et un essai témoin permettra d'en tenir compte s'ils sont présents. La mise en évidence des allantoates sera faite, suivant la technique décrite par FOSSE et son école (26).

b - Par mesure manométrique à l'appareil de WARBURG (162) de l'anhydride carbonique engendré par décarboxylation -

B - ACIDE GLYOXYLIQUE

I - PREPARATION DU GLYOXYLATE de CALCIUM $(\text{CO}_2 \cdot \text{CHO})_2 \text{Ca}$, $2 \text{H}_2\text{O}$; PM 222,17 -

On neutralise l'acide glyoxylique du commerce (Delta chemical Comp., New-York⁽¹⁾) par le carbonate de calcium pur précipité, en léger excès. On abandonne le mélange à la glacière pendant 12 heures, puis on centrifuge à fond. On sépare par décantation la liqueur colorée surnageante, on essuie la paroi du tube avec du papier filtre afin d'éliminer le décantat au maximum, on reprend le précipité de glyoxylate impur par le minimum d'eau bouillante et on filtre pour séparer l'oxalate de calcium qui accompagne toujours le glyoxylate. On laisse cristalliser à la glacière en ajoutant, si nécessaire, de l'alcool à 96° jusqu'à trouble, afin d'amorcer la cristallisation qui est lente et souvent difficile (un excès d'alcool conduit à l'obtention d'un sel de calcium d'aspect gélatineux). La préparation du sel de calcium pur conduit à des pertes très importantes, car il faut compter sur un minimum de trois recristallisations.

2 - PROPRIETES -

L'acide libre pur se présente sous la forme d'un sirop incolore cristallisant difficilement par long abandon sur l'acide sulfurique; les cristaux répondent à la formule:



Ses solutions aqueuses réduisent l'oxyde d'argent et son sel de calcium, la solution de nitrate d'argent ammoniacal à l'ébullition. Il donne une phénylhydrazone (P.F. déc. 141°) et une dinitrophénylhydrazone (P.F. déc. 188-190°) que l'on utilise pour son isolement. Le sel de calcium, le plus usuel, est soluble dans 177 p. d'eau à 8° et 40 p. à 100°; des traces d'impuretés augmentent considérablement la solubilité.

En dehors de la réaction de SCHRYVER-FOSSE, on connaît de nombreuses réactions colorées de

⁽¹⁾ L'acide glyoxylique se prépare par réduction électrolytique ou par l'amalgame de sodium de l'acide oxalique (118)

l'acide glyoxylique : coloration violet à rouge foncé avec la naphtrésorcine et l'acide chlorhydrique fumant (11), bleu avec les acides pyrogallique et sulfurique concentré (51), rouge avec les solutions aqueuses d'indol et l'acide sulfurique concentré (52), etc ... ; ces réactions colorées ne sont pas spécifiques.

Pour distinguer le formol de l'acide glyoxylique, on aura recours à la très sensible réaction au β -naphtol de FOSSE et Aut. (58, 60) : formation pratiquement immédiate avec le formol, même en très petites quantités (2 mg.), de dinaphtolméthane, corps bien cristallisé en aiguilles groupées (P.F. déc. 191-195°, après recristallisation dans le benzène). La réaction est quantitative et permet le dosage pondéral de l'aldéhyde formique. L'acide glyoxylique, par contre, ne se combine que difficilement au β -naphtol et, seules, les solutions riches en acide glyoxylique abandonnent un composé dont la solution benzénique laisse déposer des cristaux lenticulaires caractéristiques, fondant à 215° (déc.). On opérera de la manière suivante :

Dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux, on introduit 100 ml. de la solution à essayer, 300 mg. de β -naphtol et 10 ml. d'acide chlorhydrique concentré. On chauffe au reflux, en agitant au début, pour faciliter la dissolution du naphtol. Dans le cas de la présence de formol, même en très petites quantités (2 à 3 mg.), la solution se trouble immédiatement et laisse déposer des cristaux en aiguilles de dinaphtolméthane. Après 15 minutes, la réaction est totale; on laisse refroidir vers 50-60°, on essore à la trompe sur filtre taré, on lave trois fois à l'eau portée à 50-60° et on sèche à l'étuve à 100°. La méthode est quantitative et permet de doser 2 mg. de formol, avec une erreur maximum de 1,5 %. Afin de contrôler qu'il s'agit bien du dinaphtolméthane et non du dérivé de l'acide glyoxylique, on dissout les cristaux dans la soude N/10, on centrifuge, on filtre pour avoir une liqueur claire, puis on précipite le composé par addition d'acide chlorhydrique dilué. On recueille le précipité par centrifugation, on le lave à l'eau portée à 50-60°, on le sèche à 100° et on le fait recristalliser dans le benzène avant de prendre son point de fusion.

3 - DETERMINATION QUANTITATIVE -

Elle s'effectue suivant la méthode décrite page 13.

÷
÷ ÷
÷

CHAPITRE II

PRESENCE CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE D'UN CATALYSEUR DE DECARBOXYLATION DE L'ACIDE MESOXALIQUE

	Pages
A - MISE EN EVIDENCE DU CATALYSEUR	20
B - LOCALISATION DU CATALYSEUR	23
C - IMPORTANCE DE LA REACTION DU MILIEU SUR LE PROCESSUS DE DECARBOXYLATION	24
D - ACTION COMPAREE DES LEVURES HAUTE ET BASSE SUR L'ACIDE MESOXALIQUE ET SUR SON SEL DE SODIUM	26
E - ETUDE COMPAREE DES PROPRIETES DECARBOXYLANTES DES FRACTIONS SOLUBLES ET INSOLUBLES DE LEVURE	30
F - CONCLUSIONS	33

PRESENCE CHEZ SACCHAROMYCES CEREVISIAE D'UN CATALYSEUR
DE DECARBOXYLATION DE L'ACIDE MESOXALIQUE

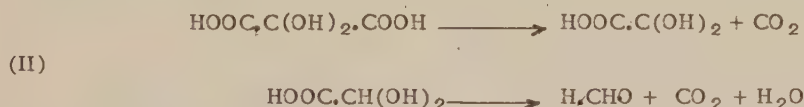
Théoriquement, l'acide mésoxalique peut présenter :

- Une décarboxylation partielle avec formation d'une molécule d'acide glyoxylique et d'une molécule d'anhydride carbonique ,



α -décarboxylation du type de celles que catalyse classiquement la carboxylase de NEUBERG.

- Une décarboxylation totale avec formation d'une molécule d'aldéhyde formique et de deux molécules d'anhydride carbonique avec l'acide glyoxylique comme terme intermédiaire ,



Les résultats différents obtenus par WETZEL (171) et par BRUNEL (24), concernant la décarboxylation de l'acide mésoxalique (voir page 3) chez les végétaux ainsi que certaines observations personnelles se rapportant aux propriétés décarboxylantes des graines et des jeunes plantules d'*Enterolobium cyclocarpum*, nous ont incité à reprendre (29), l'étude de la décarboxylation de l'acide mésoxalique par la levure.

A - MISE EN EVIDENCE DU CATALYSEUR

Les essais ont porté comparativement sur les levures haute et basse qui diffèrent par certaines de leurs propriétés⁽¹⁾. Nous avons fait agir sur le mésoxalate de sodium et sur l'acide mésoxalique, la levure vivante, la levure tuée par la chaleur et la levure toluénée.

I - Protocole expérimental -

On place au thermostat à 38° dans des erlenmeyers de 50 ml, des milieux répondant

(1) - La levure haute est plus résistante que la levure basse, elle s'autolyse moins rapidement ; par dessiccation, elle donne une levure sèche, dont toutes les cellules ne sont pas tuées, alors qu'elles le sont pour la levure basse qui ne peut plus proliférer. Enfin, la levure basse perd entièrement sa cozymase par lavage à l'eau distillée et ses phosphates se laissent facilement extraire ; dans la levure haute, la cozymase est solidement liée, ainsi que les phosphates, et l'ensemble ne se laisse pas extraire par l'eau ou seulement peu et toujours incomplètement.

aux compositions suivantes :

	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
Substrats M/500 dans l'eau distillée *	15 ml.	15 ml.	15 ml.	15 ml.
Levure haute ou basse **	1,5 g.	-	-	-
« « « portée 30' à 100° ***	-	1,5 g.	-	-
« « « toluénée ****	-	-	1,5 g.	-
« « « et portée 30' à 100°	-	-	-	1,5 g.
Eau distillée	15 ml.	15 ml.	15 ml.	15 ml.
Toluène	-	-	0,75 ml.	0,75 ml.

* Substrats - Mésoxalate M/500 : on dissout 180 mg. de mésoxalate de sodium dans 500 ml. d'eau distillée. Acide mésoxalique M/500 : dans une fiole jaugée de 500 ml., on introduit 180 mg. de mésoxalate de sodium, on ajoute 50 ml. d'eau distillée, puis 2 ml. d'acide chlorhydrique N ; après dissolution, on complète à 500 ml.

** La levure haute (levure de boulangerie) est utilisée telle quelle (humidité $\neq$ 68%). La levure basse (levure de bière), prélevée après la fermentation du mout, diluée avec de l'eau ordinaire glacée, est passée sur une toile métallique à mailles fines, qui retient les débris grossiers. On laisse reposer le filtrat, puis on décante par aspiration le liquide trouble et coloré qui surnage ; on malaxe le résidu, à la main, on dilue par l'eau ordinaire glacée, puis on décante à nouveau après repos. On répète l'opération deux fois encore avant de transvaser sur un entonnoir de Buchner garni de deux filtres en papier Chardin. On filtre très doucement à la trompe afin d'éviter le colmatage, on lave à l'eau sur filtre, en malaxant chaque fois avec les doigts, jusqu'à ce que le liquide de lavage soit incolore ; on essore à fond et conserve la levure au frigidaire (humidité $\neq$ 73%).

*** Levure portée 30 minutes à 100° - On introduit la levure dans un erlenmeyer en prenant soin de ne pas en répandre sur la paroi ; on ajoute 15 ml. d'eau et on agite avec précaution. L'erlenmeyer étant fermé par un bouchon de liège traversé par un tube de verre qui sert de réfrigérant, on le place au bain d'eau, on chauffe et on compte 30 minutes à partir du commencement de l'ébullition.

**** Levure toluénée - La levure est triturée au préalable avec le toluène et laissée en contact 5 minutes avant d'y ajouter l'eau et le substrat.

Après des temps variables, on effectue, à froid, sur une partie aliquote des différents milieux, la réaction de SCHRIVER-FOSSE caractéristique de l'acide glyoxylique ou du formol. Dans ce but, on prélève 4 ml. de liquide, on centrifuge, on décante et à 2 ml., on ajoute 2 gouttes de solution de chlorhydrate de phénylhydrazine à 4 % puis, après 2 minutes, 1,2 ml. d'acide chlorhydrique concentré et 2 gouttes de solution de

ferricyanure de potassium à 10% -

2 - Remarque -

Bien que la levure, selon WETZEL (171), ne possède aucune action décarboxylante vis-à-vis de l'acide glyoxylique, ce qui incline à penser que seule la réaction (I) doit être retenue, nous avons recherché, lorsque la réaction colorée s'est montrée positive, s'il ne se formait pas de formol. Pour cela, nous avons utilisé la réaction au β -naphtol, indiquée page 18; dans aucun cas, nous n'avons pu isoler de dinaphtolméthane: il s'agit donc bien de l'acide glyoxylique.

3 - Résultats -

Dans les conditions de nos essais, nous n'avons constaté, ni décarboxylation spontanée des substrats, ni apport d'acide glyoxylique par la levure fraîche, la levure traitée par le toluène ou portée au bain-marie à 100%.

a - Levure haute. expérience E₁ - La recherche de l'acide glyoxylique est positive après 7 heures d'action avec l'acide comme substrat et seulement après 24 heures avec le mésoxalate.

Expérience E₂ - L'action décarboxylante vis-à-vis de l'acide mésoxalique de la levure tuée par ébullition est déjà très sensible après 1 heure d'action; la décarboxylation reste faible avec le mésoxalate, mais elle est cependant plus nette que celle constatée avec la levure vivante.

Expérience E₃ - La levure tuée par le toluène se comporte sensiblement comme la levure portée 30 minutes à l'ébullition.

Expérience E₄ - Les résultats obtenus confirment ceux des expériences E₂ et E₃: le mésoxalate est faiblement décarboxylé alors que l'acide libre est très rapidement transformé en acide glyoxylique.

b - Levure basse. La levure basse se comporte comme la levure haute.

4 - Conclusions .

L'extrême sensibilité de la réaction colorée de SCHRYVER-FOSSE permet de penser que la levure vivante, dans nos conditions expérimentales, n'a qu'un faible pouvoir décarboxylant vis-à-vis de l'acide mésoxalique et que son action sur le mésoxalate peut être considérée comme inexistante.

Par contre, la levure tuée par ébullition, décarboxyle l'acide mésoxalique et, en comparaison, son action sur le mésoxalate est peu marquée. La décarboxylation que l'on obtient, après dénaturation thermique, montre que le catalyseur se différencie très nettement de la carboxylase de NEUBERG.

Enfin, la levure, dont les cellules ont été lysées par le toluène, se comporte sensiblement comme

la levure tuée par la chaleur. Le catalyseur est donc endocellulaire, son action, dans les conditions retenues ne peut se manifester qu'en dehors de la cellule.

B - LOCALISATION DU CATALYSEUR

Les expériences précédentes font ressortir qu'une destruction de l'édifice cellulaire est nécessaire pour que le catalyseur soit libéré. Nous nous sommes proposée de rechercher sa localisation en étudiant comparativement les propriétés des fractions solubles et insolubles provenant de la levure haute tuée par ébullition ou par autolyse.

1 - Levure tuée par ébullition -

On triture 5 g. de levure haute avec 50 ml. d'eau distillée, on transvase avec précaution dans un erlenmeyer et on porte au reflux 30 minutes au bain-marie bouillant. On refroidit, on agite pour homogénéiser, puis on prélève 10 ml. du mélange pour effectuer l'essai témoin T. On centrifuge la fraction restante et on décante la liqueur surnageante sur un filtre préalablement mouillé à l'eau distillée. On lave quatre fois par centrifugation la fraction insoluble, en éliminant les eaux de lavage, on filtre sur creuset G₄ et on essore à fond. On place alors au thermostat à 38° des milieux répondant aux compositions suivantes :

	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
Acide mésoxalique M/500	10 ml.	10 ml.	10 ml.	10 ml.
Levure bouillie	-	-	-	10 ml.
Filtrat de levure bouillie	-	10 ml.	10 ml.	-
Fraction insoluble	1 g.	-	1 g.	-
Eau distillée	10 ml.	-	-	-
Toluène	0,2 ml.	0,2 ml.	0,2 ml.	0,2 ml.

Expériences E₁ et E₂ - La fraction insoluble de la levure a une très forte action décarboxylante, alors que le filtrat est pratiquement inactif.

Expérience E₃ - La réunion des fractions solubles et insolubles conduit à des résultats sensiblement identiques à ceux de l'expérience T.

Expérience T - La levure tuée par ébullition, décarboxyle l'acide mésoxalique. L'acide glyoxylique est caractérisable après une heure d'action et sa teneur dans le milieu augmente avec le temps.

2 - Levure autolysée -

On triture au mortier 5 g. de levure avec 2 ml. de toluène, on transvase avec précaution dans un erlenmeyer que l'on bouche et on abandonne 20 heures à la température ordinaire. A la levure liquéfiée, on ajoute 50 ml. d'eau distillée et on laisse 24 heures en contact. On agite pour homogénéiser

puis on prélève 10 ml. pour effectuer l'essai témoin T. La suite des opérations est identique à celle décrite pour la levure bouillie. On complète le protocole par deux nouveaux essais où l'on fait agir sur le substrat, le filtrat et le précipité de levure autolysée portés, au préalable, 30 minutes au bain-marie à 100°.

Les résultats sont du même ordre que ceux obtenus avec la levure tuée par ébullition. Par ailleurs, le traitement à 100° n'apporte pas de changement : seule la fraction insoluble de la levure autolysée possède des propriétés décarboxylantes.

3 - Conclusions -

Le catalyseur de décarboxylation est localisé dans la fraction insoluble de la levure, que celle-ci soit tuée par ébullition ou par autolyse. Ce résultat permet d'éliminer l'intervention possible, dans le processus de décarboxylation, de corps solubles qui pourraient exister dans la levure et être rendus responsables du phénomène ⁽¹⁾.

C - IMPORTANCE DE LA REACTION DU MILIEU SUR LE PROCESSUS DE DECARBOXYLATION DE L'ACIDE MESOXALIQUE

La levure fraîche renferme 2,5 à 11,5 % de matières minérales constituées principalement par de l'acide phosphorique (51 à 59 %), du potassium (28 à 40% exprimé en K₂O) et du magnésium (4 à 8% exprimé en MgO). Lors du traitement de la levure par la chaleur ou par le toluène, des composés minéraux sont libérés ; il est important de connaître les modifications qu'ils apportent dans la réaction du milieu et quelle en est l'incidence sur le processus de décarboxylation. Dans ce but, nous avons déterminé au pH-mètre à l'électrode de verre, le pH des suspensions de levure et dosé l'alcalinité ou l'acidité éventuelle vis-à-vis de l'indicateur de TASHIRO ⁽²⁾. Enfin, nous avons complété ces déterminations par l'étude comparée de la décarboxylation de l'acide mésoxalique par la levure bouillie, neutralisée ou non.

1 - Déterminations potentiométriques -

Elles ont été effectuées sur des suspensions de levures préparées comme suit :

a - Levure vivante et levure portée 30 minutes au bain-marie bouillant. On délaie 2 g. de levure dans 60 ml. d'eau distillée, on attend 30 minutes et on prend le pH. Dans le cas de la levure tuée par ébullition, la levure délayée est portée 30 minutes au bain-marie bouillant et le pH est déterminé après complet refroidissement.

b - Levure toluénée portée ou non 30 minutes au bain-marie bouillant. On triture 2 g. de levure avec 1 ml. de toluène, on attend 30 minutes, on ajoute 60 ml. d'eau distillée, on porte ou non 30 minutes au bain-marie bouillant et on détermine le pH.

(1) BALLOWITZ et MEIER (6) ont montré que des composés tels que le méthylglyoxal et l'aldéhyde glycérique possédaient la propriété de décarboxyer l'acide mésoxalique à 38° en présence, il est vrai, de l'ion Cu⁺⁺.
(2) Indicateur de TASHIRO : 1 partie de méthylrouge à 0,2% dans l'alcool, 1 partie de bleu de méthylène à 0,1% dans l'alcool; pH de virage 5,4; 5,2 rouge violet; 5,4 bleu sale; 5,6 vert sale.

2 - Déterminations titrimétriques -

Elles ont été effectuées avec l'acide chlorhydrique ou la soude N/50, en présence de deux gouttes de l'indicateur de TASHIRO.

a - Levure vivante et levure portée 30 minutes au bain-marie bouillant. On délaie 1g. de levure avec 10 ml. d'eau distillée dans un tube à centrifuger. On attend 30 minutes (ou on porte 30 minutes au bain-marie bouillant), on centrifuge, on décante le liquide surnageant, on lave le résidu deux fois par centrifugation avec, chaque fois, 2 ml. d'eau, on réunit les eaux de lavage au décantat et on titre.

b - Levure toluguée portée ou non 30 minutes au bain-marie bouillant. On triture 1g. de levure avec 0,5 ml. de toluène dans un tube à centrifuger, on attend 30 minutes, on ajoute 10 ml. d'eau distillée et on porte ou non 30 minutes au bain-marie bouillant. On centrifuge, on décante le liquide surnageant sur un filtre humide (filtre sans cendres pour filtration courante, humidifié 10 minutes avant utilisation) le décantat étant trouble. On lave le résidu par centrifugation, on rince le filtre et on titre.

Les résultats concernant l'ensemble des déterminations sont consignés dans le tableau 5. Les volumes inscrits se rapportent à 1g. des levures vivante, tuée par la chaleur ou par le toluène.

TABLEAU 5

Levure et préparations de levure	Levure haute			Levure basse		
	pH	ClH N/50	NaOH N/50	pH	ClH N/50	NaOH N/50
Levure vivante	4,7	-	0,05 ml.	4,2	-	0,3 ml.
« bouillie	6,6	1,5	-	6,1	1,35 ml.	-
« toluguée	5,5	-	0,05	5,6	0,75	-
« « bouillie	6,5	1,5	-	6,2	1,40	-

La suspension de levure vivante dans l'eau, présente une réaction acide. Le traitement à l'ébullition ou par le toluène, conduit à la mise en liberté de sels alcalins à l'indicateur de TASHIRO, accompagnée d'une élévation du pH et d'une augmentation notable du pouvoir tampon du milieu comme l'indiquent les quantités d'acide titré, nécessaires pour ramener au pH de 5,4, pH de virage de l'indicateur.

Après 30 minutes, l'action du toluène est surtout manifeste pour la levure basse; la levure haute est beaucoup plus résistante et s'autolyse moins rapidement. Toutefois, traitée par le toluène elle libère des sels minéraux avec le temps: 1g. de levure haute toluguée, présente, au bout de 7 heures, une alcalinité de TASHIRO, correspondant à 0,45 ml. de ClH N/50.

3 - Décarboxylation de l'acide mésoxalique par la levure bouillie
ramenée ou non à pH 5,4 (point neutre de l'indicateur de TASHIRO)

Cette expérience quantitative préliminaire a été effectuée dans le but de connaître l'importance relative de la réaction du milieu sur le processus de décarboxylation. On porte au thermostat à 38° des milieux répondant à la composition suivante :

	E ₁	E ₂
Acide mésoxalique M/250 dans l'eau distillée	15 ml.	15 ml.
Levure haute tuée par la chaleur	1 g.	1 g.
CH ₃ COOH/50 pour ramener à pH 5,4	-	1,5 ml.
Eau distillée	15 ml.	13,5 ml.
Toluène	0,3 ml.	0,3 ml.

Après des temps variables, on dose l'acide glyoxylique provenant de la décarboxylation de l'acide mésoxalique en suivant le mode opératoire donné page 13; les résultats sont consignés dans le tableau 6.

TABLEAU 6

Temps d'action en heures	Acide mésoxalique décarboxylé %	
	Levure bouillie de pH 6,6	Levure bouillie ramenée à pH 5,4
2,30 h	8,4	10,7
6,30	14,5	20,1
9,30	22,6	30,9
24	33,0	51,0

L'examen du tableau 6 montre toute l'importance de la réaction du milieu sur le processus de décarboxylation, une différence initiale de 1,2 unité pH suffit, après 24 heures, pour entraîner une augmentation de 1/3 de l'acide mésoxalique décarboxylé.

D - ACTION COMPAREE DES LEVURES HAUTE ET BASSE SUR LE MESOXALATE DE SODIUM
ET L'ACIDE MESOXALIQUE

L'expérience précédente ayant montré que des résultats comparables ne peuvent être obtenus qu'à partir de levures ramenées au même pH, nous avons déterminé, avant de commencer la série

des expériences ci-après, les quantités d'acide ou de base nécessaires pour ramener les échantillons de levure à pH 5,4 (voir page 24).

I - Protocole expérimental -

On place au thermostat à 38°, dans des erlenmeyers de 100 ml., des milieux répondant aux compositions suivantes :

	E ₁	E ₂	T ₁	T ₂
Solution de mésoxalate de sodium M/250	25 ml.	-	25 ml.	-
Solution d'acide mésoxalique M/250	-	25 ml.	-	25 ml.
Levures	1,5 g.	1,5 g.	-	-
ClH ou NaOH N/50 p. ramener à pH 5,4	v.ml.	v.ml.	-	-
Eau distillée, Q.S.	50 ml.	50 ml.	50 ml.	50 ml.
Toluène	n.ml.	n.ml.	n.ml.	n.ml.

La quantité de toluène à ajouter est de 0,4 ml., sauf dans le cas des essais effectués avec la levure vivante. Les expériences T₁ et T₂ permettent de déterminer si, au thermostat à 38° et avec le temps, les substrats ne subissent pas un commencement de décarboxylation. Remarquons que, dans les conditions de nos essais, nous n'avons pas constaté de décarboxylation spontanée des substrats.

2 - Dosage de l'acide glyoxylique engendré par décarboxylation.

Il comporte la détermination de la quantité de soude à ajouter à chaque prise d'essai afin de se trouver dans les conditions requises pour le dosage de l'acide glyoxylique en milieu neutre à l'indicateur de TASHIRO, puis le dosage de cet acide à l'électrophotomètre. Après des temps variables on retire les fioles du thermostat, on agite pour homogénéiser et on prélève à la pipette dans chaque fiole deux prises d'essai de 5 ml. puis, on replace les fioles au thermostat.

a - Détermination de la quantité de soude. A la première prise d'essai, introduite dans un tube à centrifuger, on ajoute 5 ml. d'eau distillée, on centrifuge, on décante avec précaution le liquide surnageant dans un bécher, on lave deux fois le culot de centrifugation avec, chaque fois, 3 ml. d'eau et on joint les eaux de lavage au décantat. On ajoute 2 gouttes de l'indicateur et, à la microburette, la quantité de soude N/50 nécessaire à la neutralisation, soit v.ml.

b - Dosage de l'acide glyoxylique. A la seconde prise d'essai de 5 ml., introduite dans une fiole jaugée de capacité V convenable, on ajoute de l'eau distillée et les v.ml. de soude pour neutraliser, on amène au trait de jauge, on agite, puis on centrifuge une fraction de la liqueur qui tient la partie insoluble en suspension. Sur le décantat, on effectue, à la pipette de précision, des prélèvements de 2 ml., sur lesquels on dose l'acide glyoxylique, comme il est indiqué page 13.

c - Remarques La turbidité des milieux ne permet pas d'apprécier avec netteté le bord inférieur du ménisque, lors du prélèvement des 5 ml. à la pipette; pour ces mesures de volume, on se réfèrera au bord supérieur du ménisque.

- Il arrive, au cours de la détermination de la quantité de soude à ajouter, qu'après centrifugation, la liqueur surnageante reste trouble; dans ce cas, on filtrera sur un filtre sans cendres, préalablement mouillé à l'eau 15 minutes avant l'emploi.

- La capacité V des fioles jaugées, sera choisie en fonction de l'activité du catalyseur et du temps d'action. On retiendra, quel que soit le temps d'action, des fioles de 25 ml. lorsqu'on utilise comme substrat le mésoxalate de sodium, dans le cas de l'acide mésoxalique, la capacité des fioles jaugées à retenir, varie entre 25 et 200 ml.

- Il est inutile de déféquer par le tungstate de soude et l'acide sulfurique, car on obtient d'emblée des liqueurs limpides que ne trouble pas l'addition ultérieure des réactifs. Si, après centrifugation de la liqueur servant au dosage de l'acide glyoxylique, on constate la présence de particules en suspension, on filtrera sur filtre sans cendres, sec, avant de prélever les 2 ml.

- Enfin, l'exécution du dosage en milieu neutre, présente l'avantage d'arrêter l'action du catalyseur qui perd alors ses propriétés décarboxylantes (voir page 36),

3 - Résultats -

Les pourcentages de transformation des substrats, exprimés en acide mésoxalique décarboxylé après des temps variables, sont consignés dans les tableaux 7, 8, 9 et 10.

SUBSTRAT : Mésoxalate de sodium

TABLEAU 7

Levure haute

Levures et préparations de levure	2,30 h.	6,30 h.	9,30 h.	24 h
Levure fraîche	0	0,4	0,6	0,7
« « portée 30' à 100°	0,9	1,4	1,7	2,8
« « tolénée	1,6	2,5	3,5	5,6
« « « portée 30' à 100°	1,0	1,3	1,7	2,5

TABLEAU 8

Levure basse

Levures et préparations de levure	2,30 h.	6,30 h.	9,30 h.	24 h.
Levure fraîche	0,3	0,7	1,1	1,8
« « portée 30° à 100°	0,9	1,3	1,6	2,0
« « toluénée	0,9	1,5	2,2	4,2
« « ,portée 30° à 100°	0,9	1,4	1,8	3,0

SUBSTRAT : Acide mésoxalique

TABLEAU 9

Levure haute

Levures et préparations de levure	2,30 h.	6,30 h.	9,30 h.	24 h.
Levure fraîche	0,3	0,9	1,2	2,2
« « portée 30° à 100°	9,2	17,5	27,0	47,5
« « toluénée	3,4	6,5	8,9	14,9
« « ,portée 30° à 100°	7,9	14,3	21,6	39,2

TABLEAU 10

Levure basse

Levures et préparations de levure	2,30 h.	6,30 h.	9,30 h.	24 h.
Levure fraîche	2,2	4,5	6,8	8,9
« « portée 30° à 100°	8,6	16,2	21,9	36,0
« « toluénée	3,7	7,0	11,2	22,5
« « ,portée 30° à 100°	6,2	11,5	17,0	32,5

Ces résultats confirment ceux obtenus au cours des essais qualitatifs . La levure vivante, haute ou basse, ne présente qu'un faible pouvoir décarboxylant vis-à-vis de l'acide mésoxalique et de son sel de sodium . Par contre, la levure portée au préalable à 100° ou traitée par le toluène se comporte très différemment :

- Avec le mésoxalate comme substrat, les pourcentages de transformation restent peu élevés ; ils sont maxima pour la levure toluénée ,
- Avec l'acide mésoxalique, la décarboxylation est importante; elle est particulièrement marquée pour la levure portée, au préalable, à l'ébullition .

E - ETUDE COMPAREE DES PROPRIETES DECARBOXYLANTES DES FRACTIONS

SOLUBLES ET INSOLUBLES OBTENUES A PARTIR DE LA LEVURE

Les essais qualitatifs (voir page 23) avaient permis de constater que les fractions insolubles possédaient, seules, des propriétés décarboxylantes marquées, les fractions solubles étant pratiquement sans action sur l'acide mésoxalique . Il importait de confirmer quantitativement ces résultats préliminaires, en tenant compte des constatations faites sur l'importance de la réaction du milieu.

Les fractions solubles et insolubles ont été préparées de la façon suivante :

- Cas de la levure tuée par ébullition . On ajoute à 50 g. de levure 100 ml. d'eau distillée, on homogénéise et on introduit le mélange dans un erlenmeyer muni d'un tube réfrigérant. On place l'erlenmeyer dans un bain d'eau et on laisse 15 minutes à compter du début de l'ébullition . On retire du bain, on refroidit, puis on centrifuge . On recueille le décantat sur un filtre sans cendres à filtration lente et on détermine son activité décarboxylante . Le culot de centrifugation est lavé quatre fois à l'eau distillée, puis à l'alcool et à l'éther, et enfin séché dans le vide .

- Cas de la levure autolysée . On pèse 50 g. de levure que l'on triture dans un mortier avec 5 ml. de toluène . On introduit le mélange dans un erlenmeyer de 300 ml. et on abandonne à la température du laboratoire jusqu'à liquéfaction . A la levure liquéfiée, on ajoute 100 ml. d'eau distillée et on place le mélange 24 heures au bain-marie à 32° , pour parfaire l'autolyse . Ensuite, on centrifuge pour obtenir, comme précédemment, les fractions solubles et insolubles .

Les fractions provenant de la levure tuée par ébullition ou par autolyse possèdent les caractéristiques résumées dans le tableau 11 .

TABLEAU 11

Préparations de levure haute	Valeur du pH	Alcalinité (Tashiro) en ClH N/50
Levure tuée par ébullition, Fraction soluble	6,1	0,90 ml.
« « « « insoluble	6,9	0,05
« « « autolyse, Fraction soluble	6,2	1,20
« « « « insoluble	6,7	0,05

Le pH a été déterminé sur la suspension de 0,4 g. d'insoluble dans 40 ml. d'eau distillée et sur la fraction soluble préalablement diluée dans des proportions identiques à celles des expériences ci-dessous. Les quantités d'acide chlorhydrique N/50 indiquées, se rapportent à la neutralisation en présence de l'indicateur de TASHIRO, d'une part, de 0,2 g. d'insoluble et, d'autre part, d'un volume de la fraction soluble correspondant à 1g. de levure fraîche.

L'examen du tableau 11 montre que les fractions solubles possèdent un pouvoir tampon non négligeable : il faut 0,9-1,2 ml. de ClH N/50 pour ramener le pH de 6,1-6,2 à 5,4 ; dans le cas des fractions insolubles, une goutte d'acide N/50 est suffisante.

Protocole expérimental - On fait agir sur l'acide mésoxalique et sur son sel de sodium les fractions solubles et insolubles ramenées à pH 5,4 ; dans ce but, on place au thermostat à 38° des milieux répondant aux compositions suivantes :

	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
Substrats M/250 dans l'eau distillée	20 ml.	20 ml.	20 ml.	20 ml.
Levure bouillie, fraction soluble *	3 ml.	-	-	-
« « « insoluble	-	0,4 g.	-	-
« autolysée « soluble *	-	-	3 ml.	-
« « « insoluble	-	-	-	0,4 g.
ClH N/50 pour amener à pH 5,4	1,2 ml.	0,05 ml.	1,6 ml.	0,05 ml.
Eau distillée	15,8 ml.	20 ml.	15,4 ml.	20 ml.
Toluène	0,2 ml.	0,2 ml.	0,2 ml.	0,2 ml.

* 3 ml. de la fraction soluble correspondent sensiblement à 1,3 g. de levure fraîche.

L'acide glyoxylique engendré est dosé, après des temps d'action variables ; les résultats, exprimés en pour cent d'acide mésoxalique décarboxylé, sont consignés dans les tableaux 12 et 13.

TABLEAU 12

Substrat : Mésoxalate de sodium

Préparations de levure	Temps en heures			
	2,30 h.	6,30 h.	9,30 h.	24 h
Levure tuée par ébullition				
Fraction soluble	0,6	0,6	0,7	0,8
" insoluble	0,5	0,6	0,8	1,1
Levure tuée par autolyse				
Fraction soluble	3,1	3,2	3,4	3,6
" insoluble	0,4	0,7	1,1	1,9

TABLEAU 13

Substrat : Acide mésoxalique

Préparations de levure	Temps en heures			
	2,30 h.	6,30 h.	9,30 h.	24 h.
Levure tuée par ébullition				
Fraction soluble	0,2	0,4	0,5	1,2
" insoluble	15,5	32,7	44,9	74,3
Levure tuée par autolyse				
Fraction soluble	2,2	2,9	3,5	5,8
" insoluble	7,3	13,8	18,1	32,7

Le catalyseur de décarboxylation se localise pratiquement dans les fractions insolubles; celles préparées, à partir de la levure haute tuée par ébullition, sont de beaucoup les plus actives. La décarboxylation n'intéresse pratiquement que l'acide mésoxalique.

En ce qui concerne les fractions solubles, le comportement de celles obtenues, à partir de la levure autolysée, mérite d'être retenu: on constate qu'elles présentent un pouvoir décarboxylant non négligeable, aussi bien vis-à-vis de l'acide mésoxalique, que de son sel.

F - CONCLUSIONS

La levure de bière possède la propriété de décarboxyler l'acide mésoxalique. La levure vivante est peu active ; son action, faible sur l'acide mésoxalique, est pratiquement nulle sur le mésoxalate. Doit-on penser à une différence de comportement de la membrane cellulaire qui laisserait pénétrer l'acide libre, non dissocié, de préférence à l'ion mésoxalique, ou la faible décarboxylation constatée a-t-elle pour cause la diffusion du catalyseur, par suite de la mort de certaines cellules en milieu acide (voir page 94) ? Il semble que ces deux possibilités puissent se réaliser simultanément . La première a déjà été signalée pour l'acide pyruvique ⁽¹⁾, quant à la seconde, la forte activité décarboxylante des préparations de levure, où les cellules sont détruites, en apporte une confirmation .

Le catalyseur est endocellulaire ; il existe dans la fraction insoluble provenant de la levure tuée par ébullition ou par autolyse . Par autolyse, on obtient une préparation dont les propriétés décarboxylantes sont moins accusées ; il est vrai que l'autolyse s'accompagne toujours d'une scission des protéines, qui serait susceptible de faire disparaître ou de modifier la structure de certains groupements essentiels au fonctionnement du catalyseur . De plus, l'activité décarboxylante, non négligeable, de la fraction soluble de levure autlysée, laisse supposer le passage en solution de composés de faible poids moléculaire, faisant initialement partie intégrante de la molécule protéique, et doués d'une certaine activité décarboxylante .

Enfin, le rôle joué par la réaction du milieu dans le processus de décarboxylation s'avère primordial.



(1) - La levure fraîche vivante décarboxyle l'acide libre, elle est sans action sur le sel de sodium qui ne pénètre pas dans la cellule (108). De même, s'expliquent les contradictions observées en ce qui concerne l'effet des malonates sur la respiration des végétaux (160, 102). Seul, l'acide malonique non dissocié peut servir comme pénétrant cellulaire, de telle sorte que des pH bas sont essentiels .

CHAPITRE III

CONDITIONS EXPERIMENTALES DE LA DECARBOXYLATION DE L'ACIDE MESOXALIQUE

	Pages
A - DETERMINATION du pH OPTIMUM D'ACTION	36
B - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LE PROCESSUS DE DECARBOXYLATION	39
C - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT SUR LE PROCESSUS DE DECARBOXYLATION	41
D - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CATALYSEUR SUR LE PROCESSUS DE DECARBOXYLATION	44
E - MARCHE DU PROCESSUS DE DECARBOXYLATION EN FONCTION DU TEMPS	44
F - ETUDE DE L'ACTION DES EFFECTEURS	49
G - CONCLUSIONS	52

CONDITIONS EXPERIMENTALES DE LA DECARBOXYLATION DE L'ACIDE MESOXALIQUE

Pour déterminer les conditions optimales de la décarboxylation (30), nous avons retenu l'insoluble de levure haute obtenu après traitement par la chaleur. Ce choix, qui peut paraître critiquable, car il conduit à effectuer les mesures sur un contenu cellulaire modifié par dénaturation, a été guidé par les considérations ci-après. La fraction insoluble de la levure se présente sous l'aspect d'une poudre homogène, son action décarboxylante est très marquée, elle renferme la presque totalité du catalyseur et elle est exempte de sels minéraux en proportion notable. Cependant, et afin de montrer que la décarboxylation de l'acide mésoxalique n'est pas un phénomène lié à la dénaturation, mais qu'il s'agit d'une nouvelle propriété des levures, dont le système enzymatique n'est pas détruit, certains de nos essais seront effectués avec la levure sèche intacte comme source de catalyseur. Contrairement à l'insoluble, la levure sèche présente un pouvoir tampon non négligeable et dans nos conditions expérimentales, son utilisation à l'appareil de WARBURG rend les mesures délicates. Le dégagement d'anhydride carbonique qui lui est propre, disproportionné par rapport à celui provenant de l'acide mésoxalique, ne permet pas de déterminer avec la précision désirable, l'importance de la décarboxylation du cétoacide.

Préparation de la levure sèche intacte -

On malaxe 250 g. de levure de boulangerie avec 3 litres d'eau ordinaire, on laisse reposer à la glacière, puis on filtre sur un creuset en verre fritté N° 4, en agitant constamment pour éviter le colmatage du filtre. On reprend la levure ainsi lavée par 1 litre d'eau distillée, on filtre à nouveau et onessore à fond. La levure, préalablement émiettée, est ensuite séchée dans le vide sur chlorure de calcium : on la conserve à la glacière dans un flacon bouché à l'émeri et on la broie au moment de l'emploi.

Préparation de l'insoluble de levure haute -

On ajoute à 50 g. de levure, préalablement lavée comme il est indiqué plus haut, 100 ml. d'eau distillée, on homogénéise et on introduit le mélange dans un erlenmeyer muni d'un tube réfrigérant. On place l'erlenmeyer dans un bain d'eau et on laisse 15 minutes à compter du début de l'ébullition. On retire du bain, on refroidit puis on centrifuge. On lave le précipité par centrifugation trois fois à l'eau distillée, deux fois à l'alcool à 96°, deux fois à l'éther et on le sèche à 48-50° à l'étuve jusqu'à disparition totale de l'éther. On tamise sur toile métallique fine. La fraction insoluble se présente sous l'aspect d'une poudre blanchâtre.

÷
÷ ÷
÷

A - DETERMINATION du pH OPTIMUM D'ACTION

Les résultats précédemment acquis laissent supposer que l'optimum de décarboxylation se trouve dans la zone acide des pH ; aussi, avons-nous retenu, pour cette étude, les tampons ci-après (25) :

Acide chlorhydrique-citrate de SÖRENSEN : pH 1,04 à 4,96
 Acide chlorhydrique-chlorure de potassium de CLARK et LUBS : pH 1,0 à 2,2
 Glycolle-acide chlorhydrique de SÖRENSEN : pH 1,04 à 4,68
 Biphtalate-acide chlorhydrique et biphtalate-soude de CLARK et LUBS : pH 2,2 à 6,3
 Phosphate disodique-acide citrique de Mac ILVAINE : pH 2,2 à 8,0

Protocole expérimental -

Il est identique pour tous les tampons; on porte, au thermostat à 38°, des milieux répondant aux compositions suivantes :

	E	T
Solution aqueuse de mésosalate de sodium M/250	10 ml.	10 ml.
Solutions tampons de pH variables	10 ml.	10 ml.
Insoluble de levure	0,2 g.	-
Toluène	0,2 ml.	0,2 ml.

Après 15 heures d'action, on dose l'acide glyoxylique dans E et T en se plaçant dans les conditions du dosage en milieu neutre. L'essai témoin T est destiné à connaître le comportement du substrat à la température de 38° et aux pH étudiés. Remarquons que, quel que soit le tampon, nous n'avons pas constaté de décarboxylation du substrat. Par ailleurs, nous avons contrôlé qu'en aucun cas, l'insoluble de levure n'apportait d'acide glyoxylique. Les résultats obtenus, exprimés en pour cent d'acide mésoxalique décarboxylé, figurent dans les tableaux 14, 15, 16, 17 et 18 ; ils ont servi à tracer les courbes de la figure 1.

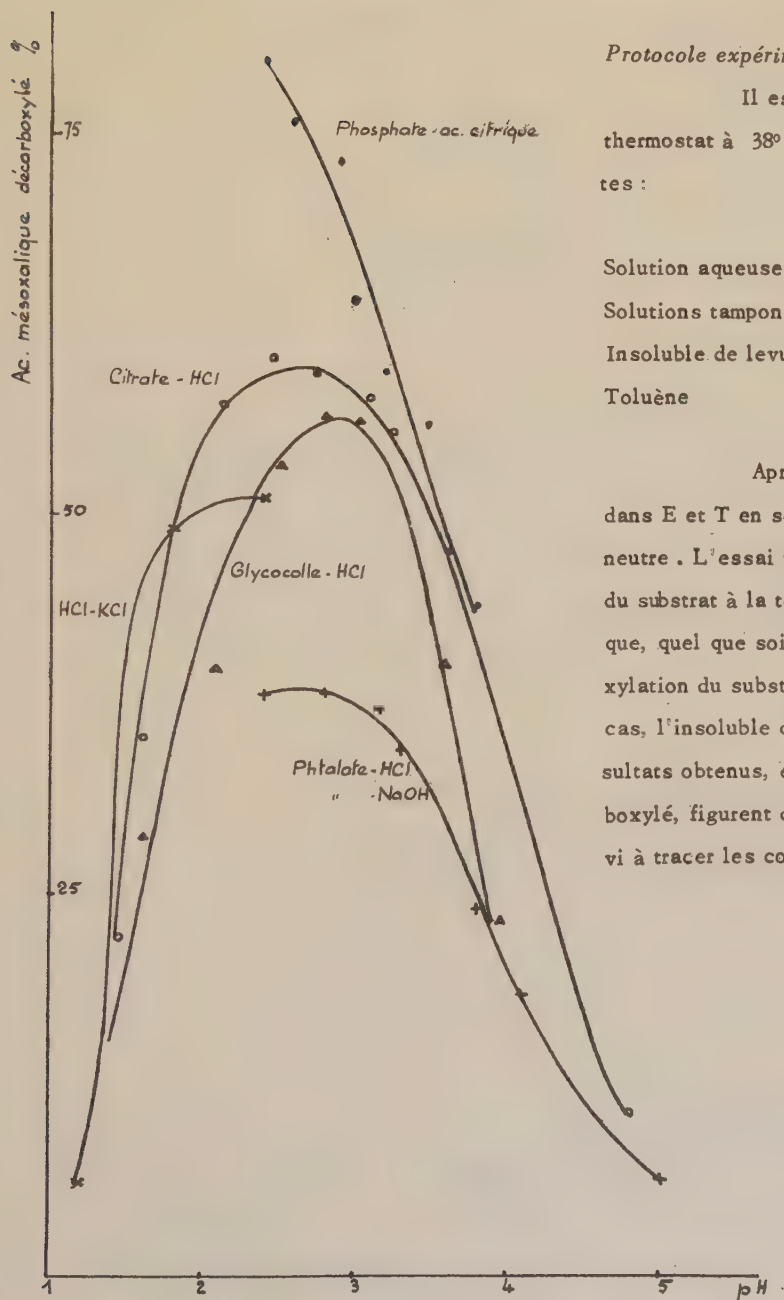


Figure 1

TABLEAU 14
Tampon citrate-HCl

Valeur initiale du pH des essais	1,4	1,6	2,1	2,45	3,2	3,55	4,8
Acide mésoxalique décarboxylé %	20,4	34,8	57,3	61,6	55,7	47,5	10,5

TABLEAU 15
Tampon HCl-KCl

Valeur initiale du pH des essais	1,2	1,8	2,4
Ac. mésoxalique décarboxylé %	6,2	49,8	50,5

TABLEAU 16
Tampon glycolle-HCl

Valeur initiale du pH des essais	1,35	1,45	1,6	1,85	2,1	2,5	2,8	3,1	3,55	3,9
Ac. mésoxalique décarboxylé %	14,6	19,6	28,6	35,3	39,1	53,2	56,7	56,2	42,7	23,3

TABLEAU 17
Tampon biphtalate-HCl et biphtalate-soude

Valeur initiale du pH des essais	2,4	2,8	3,2	3,8	4,1	5,0
Ac. mésoxalique décarboxylé %	38,0	38,1	37,2	24,0	18,4	6,2

TABLEAU 18
Tampon phosphate- acide citrique

Valeur initiale du pH des essais	2,4	2,6	2,85	3,0	3,2	3,45	3,6	3,8
Ac. mésoxalique décarboxylé %	79,7	71,3	68,1	64,2	59,2	55,7	53,0	43,7

Dans nos conditions expérimentales (mésosalate M/500) et pour le tampon citrate-HCl, les pourcentages de décarboxylation les plus élevés s'observent entre pH 2,1 et pH 3,2, l'optimum étant voisin de pH 2,4. Pour le tampon HCl-KCl, on note encore que les transformations sont moins importantes pour les pH inférieurs à 2,4. Avec le tampon glycolle-HCl, on observe un déplacement de l'optimum qui se situe vers pH 2,8-3,1 ; notons que c'est le seul tampon étudié qui renferme dans sa composition une substance à fonction amine.

La nature des constituants du mélange tampon présente une influence notable ; le tampon biphtalate HCl conduit aux transformations les plus faibles, comme si l'acide phthalique possédait un certain pouvoir inhibiteur. C'est avec le tampon phosphate-acide nitrique, que le pourcentage de substrat transformé est le plus considérable ; aussi, l'avons-nous retenu pour les essais ultérieurs.

B - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LE PROCESSUS DE DECARBOXYLATION

On place, au thermostat, à différentes températures, des milieux répondant aux compositions suivantes :

	E	T
Solution aqueuse de mésosalate de sodium M/250	10 ml.	10 ml.
Solution tampon	10 ml.	10 ml.
Insoluble de levure	0,2 g.	-
Toluène	0,2 ml.	0,2 ml.

L'expérience T est destinée à connaître si, au pH optimum d'action et aux différentes températures, l'acide mésoxalique ne se décarboxyle pas spontanément ; quelle que soit la température retenue, nous n'avons pas constaté de décarboxylation du substrat même après 15 heures d'action. Les résultats, exprimés en pour cent d'acide mésoxalique décarboxylé en fonction du temps, sont consignés dans les tableaux 19, 20, 21 et 22.

TABLEAU 19
Tampon citrate-HCl (valeur initiale du pH des essais : 2,45)

Temps d'action	Températures				
	29°	38°	44°	50°	59°
2 heures	4,4	12,0	21,9	32,2	47,0
5 "	8,5	25,9	45,9	64,9	96,0
9 "	16,5	43,8	71,3	87,2	-
15 "	25,0	55,8	78,4	-	-

TABLEAU 20

Tampon glycolle-HCl (valeur initiale du pH des essais 2,8)

Temps d'action	Températures				
	29°	38°	44°	50°	59°
2 heures	4,2	11,8	21,3	32,7	48,7
5 «	8,5	26,5	47,0	63,9	94,5
9 «	15,4	44,8	69,6	83,1	-
15 «	24,7	56,1	78,4	-	-

TABLEAU 21

Tampon biphtalate-HCl (valeur initiale du pH des essais 2,4)

Temps d'action	Températures				
	29°	38°	44°	50°	59°
2 heures	2,6	7,2	14,9	23,2	42,5
5 «	6,0	16,5	32,8	49,0	73,0
9 «	10,9	28,7	58,6	71,7	-
15 «	17,3	35,5	63,5	87,9	-

TABLEAU 22

Tampon phosphate-ac.citrique (valeur initiale du pH des essais 2,4)

Temps d'action	Températures				
	29°	38°	44°	50°	59°
2 heures	4,6	13,9	26,5	35,4	57,3
5 «	10,0	28,4	55,1	77,0	100,7
9 «	17,6	49,5	81,4	96,6	-
15 «	28,3	58,0	94,4	-	-

La quantité d'acide mésoxalique décarboxylé croît en fonction de la température et il n'y a pas d'optimum . Ici, encore, la nature des constituants du mélange tampon présente une certaine importance ; les transformations les plus élevées s'observent avec le tampon phosphate-acide citrique . la décarboxylation est totale après 5 heures à 59° .

Dans le but ultérieur d'établir une méthode de recherche et de dosage rapide de l'acide mésoxalique chez les végétaux, nous avons étudié la décarboxylation de ce cétoacide (solution de mésoxalate de sodium M/ 1000 dans le tampon phosphate-acide citrique de pH 2,2) à la température du bain-marie bouillant . Les résultats sont consignés dans le tableau 23 .

TABLEAU 23

Temps en minutes	Ac. mésoxalique en mg.p. litre		Acide mésoxalique décarboxylé %
	Théorie	Détruit	
6	272	206,8	76,0
12	«	252,7	92,9
15	«	268,9	98,8
18	«	270,4	99,4
24	«	271,1	99,7
30	«	275,7	101,3
45	«	274,2	100,8

Aux erreurs d'expérience près, la décarboxylation est déjà pratiquement totale après 15 minutes et l'acide mésoxalique se retrouve quantitativement à l'état d'acide glyoxylique dans le milieu . Remarquons que, dans ces conditions expérimentales, mais en l'absence de catalyseur, la stabilité de l'acide mésoxalique reste encore pratiquement vérifiée : à 100° et après 30 minutes, la décarboxylation spontanée du cétodiacide n'excède pas 3 % .

Ces résultats apportent, de plus, une confirmation de la valeur de la méthode de dosage de l'acide mésoxalique à l'état d'acide glyoxylique .

C - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT SUR LE PROCESSUS DE DECARBOXYLATION

Le mésoxalate de sodium, aux concentrations supérieures à M/ 500, modifie sensiblement le pH , initialement de 2,2 , du tampon phosphate-acide citrique. Ainsi, pour les concentrations M/ 250, M/ 100, M/ 50 et M/ 25 les pH des solutions passent respectivement à 2,4 - 2,7 - 2,9 et 3,2 . Par addition d'acide chlorhydrique, il eût été facile de ramener les différents milieux au pH optimum d'action, déterminé précédemment . Toutefois, et afin de ne pas modifier la nature du mélange tampon, nous avons, dans une expérience préliminaire, étudié l'influence de la concentration en substrat, en nous plaçant au pH de la solution M/ 25

en mésoxalate . Les solutions de titres inférieurs ont été préparées par dilution de la solution M/ 25 avec du tampon de pH 3,2 dilué au demi.

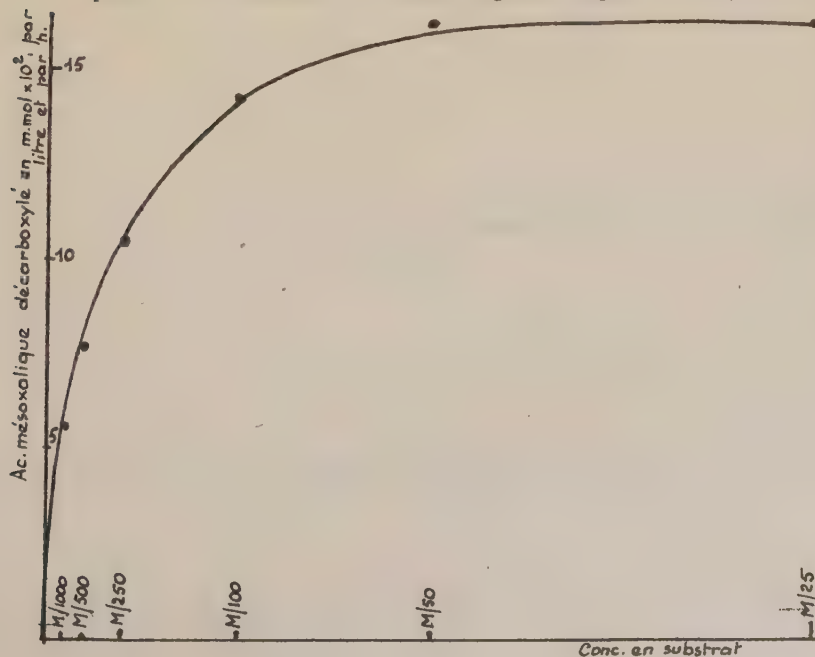
Protocole expérimental -

On porte au thermostat à 38° , 4 ml. de chacun des milieux renfermant 40 mg. d'insoluble de levure (pH initial des essais 3,3) . Après 2 heures d'action, on dose l'acide glyoxylique formé ; les résultats sont consignés dans le tableau 24 (fig. 2)

TABLEAU 24

Concentration en substrat		Ac. mésoxalique décarbox. p. l.		Vitesse (mmol. $\times 10^2$ d'ac. mésoxalique décarboxylé par heure)
en mg. %	en mol.	en mg.	en mmol. $\times 10^2$	
136	M/ 1000	15,2	11,2	5,6
181,3	M/ 750	17,7	13,0	6,5
272	M/ 500	21,4	15,5	7,75
544	M/ 250	28,7	21,1	10,5
1.360	M/ 100	38,8	28,5	14,25
2.720	M/ 50	44,2	32,5	16,25
5.440	M/ 25	44,2	32,5	16,25

L'examen des résultats montre que la vitesse de transformation tend vers une valeur limite atteinte pour une concentration en substrat égale ou supérieure à M/ 50 .



Ensuite, nous avons déterminé les quantités d'acide mésoxalique décarboxylé pour une concentration M/ 50 en substrat , mais en ramenant cette fois le pH des essais à 2,4 par addition, soit d'acide chlorhydrique, soit d'acide citrique (tableau 25) ; en opérant ainsi, on se plaçait dans les conditions optimales de pH fixées page 39 .

Figure 2

TABEAU 25

pH des essais	Ac. mésoxalique décarboxylé en mg.p.l. en 2 heures à 38°
2,4 (par addition de HCl)	39,0
2,4 (par addition d'ac. citrique)	37,5
3,3 (essai comparatif)	44,2

Les valeurs trouvées indiquent que les quantités d'acide mésoxalique décarboxylé à pH 2,4, sont moindre qu'à pH 3,3, ce qui laisserait supposer un déplacement de l'optimum de pH. Aussi, nous avons repris l'étude de la décarboxylation du cétoacide, en fonction du pH, en retenant les concentrations de M/50 en substrat et de 1 % en catalyseur (Température : 38° ; durée d'action : 2 heures). Les résultats obtenus avec le tampon phosphate-acide citrique figurent dans le tableau 26.

TABEAU 26

Valeur initiale du pH des essais *	Ac. mésoxalique décarboxylé en mg. par litre	Valeur initiale du pH des essais *	Ac. mésoxalique décarboxylé en mg. par litre
2,4	39,0	3,8	44,2
2,7	41,5	3,9	42,7
3,0	43,7	4,1	38,1
3,1	43,7	4,3	27,8
3,3	44,6	4,7	15,3
3,4	44,6	5,2	7,1
3,6	44,2	5,8	3,8

* Toutes les valeurs ont été déterminées au pH-mètre à l'électrode de verre sur les milieux tamponnés renfermant le mésoxalate et l'insoluble de levure ; les pH de 2,4 et de 2,7 ont été obtenus par addition d'acide chlorhydrique.

A la suite de ces déterminations, la décarboxylation de l'acide mésoxalique apparaît optimum et d'importance sensiblement égale pour la zone de pH comprise entre 3,0 et 3,8 ⁽¹⁾

(1) - L'utilisation du tampon citrate-HCl rend également compte du déplacement de l'optimum de pH quand la concentration en substrat devient M/50.

TABLEAU 28

Insoluble de levure (valeur initiale du pH des essais 3,0)

Temps en heures	Ac. mésoxalique décarboxylé par litre		Vitesse (mmol. $\times 10^2$ d'ac. mésoxalique décarboxylé par heure)
	en mg.	en mmol. $\times 10^2$	
0,30	10,1	7,43	14,8
1	24,2	17,8	17,8
2	43,8	32,2	16,1
3	69,3	51,0	17,0
4	92,2	67,8	16,9
5	110,0	80,9	16,2

TABLEAU 29

Levure sèche intacte (valeur initiale du pH des essais 3,1)

Temps en heures	Ac. mésoxalique décarboxylé par litre		Vitesse (mmol. $\times 10^2$ d'ac. mésoxalique décarboxylé par heure)
	en mg.	en mmol. $\times 10^2$	
0,30	8,6	6,32	12,64
1	18,0	13,24	13,24
2	36,3	26,7	13,35
3	49,6	36,5	12,2
4	74,2	54,6	13,6
5	88,0	64,7	12,9

Dans les conditions expérimentales fixées, la décarboxylation de l'acide mésoxalique est directement proportionnelle au temps d'action, que l'on utilise l'insoluble de levure ou la levure sèche intacte comme source de catalyseur. Toutefois, avec la levure sèche intacte, la vitesse de transformation est moins élevée.

2 - Résultats obtenus par dosage manométrique de l'anhydride carbonique à l'appareil de WARBURG.

Si on calcule la correspondance en anhydride carbonique de l'acide glyoxylique engendré en 2 heures par décarboxylation de l'acide mésoxalique - en se basant sur les résultats des essais précédents - on obtient un volume de l'ordre de 14 mm^3 . Ce volume est insuffisant si l'on se propose d'effectuer des lectures manométriques pendant des temps courts, 15 minutes par exemple. Pour remédier à cet inconvénient, notre seule possibilité était d'augmenter la teneur en catalyseur. Après avoir, au préalable, véri-

fié par la méthode à l'acide glyoxylique, que la transformation restait proportionnelle pour des teneurs en insoluble de levure^{ou en levure} sèche intacte, supérieures à 2 %, nous avons retenu la concentration de 4 g. pour 100 ml.

a - Cas de l'insoluble de levure .

On introduit :

	E	T ₁	T ₂	Thermo- baromètre
Dans la cellule :				
Suspension d'insoluble à 5% dans tampon phosphate-ac.citrique de pH 2,2 dilué au 1/2	1,6 ml.	-	-	-
Tampon de pH 2,2 dilué au 1/2	-	1,6ml.	-	-
Suspension d'insoluble à 5% dans tampon phosphate-ac.citrique de pH 3,0 dilué au 1/2	-	-	1,6 ml.	-
Tampon de pH 3,0 dilué au 1/2	-	-	-	2 ml.
Dans l'ampoule latérale :				
Mésoxalate de sodium M/ 10 dans tampon phosphate-ac. citrique de pH 2,2 dilué au 1/2	0,4 ml.	0,4 ml.	-	-
Tampon de pH 3,0 dilué au 1/2 (Air, T = 38°)	-	-	0,4 ml.	-

On effectue les lectures manométriques de 15 en 15 minutes . En fin d'expérience (2 heures), on transvase quantitativement le contenu de E dans une fiole jaugée de 250 ml. , renfermant la quantité de soude N/ 10 nécessaire pour se trouver en milieu neutre à l'indicateur de TASHIRO; on dose ensuite l'acide glyoxylique apparu par décarboxylation de l'acide mésoxalique . Les résultats sont consignés dans le tableau (30) (fig. 5 page suivante)

TABLEAU 30

Temps en minutes	E(Essai n° 1)			E(Essai n° 2)			T ₁ et T ₂	
	mm ³ CO ₂ p. 2 ml.	mmol. × 10 ² p. litre		mm ³ CO ₂ p. 2 ml.	mmol. × 10 ² p. litre			mm ³ CO ₂ p. 2 ml.
		de CO ₂	d'ac. glyox.		de CO ₂	d'ac. glyox.		
15	5,62	12,54		6,32	14,96			
30	11,94	26,66		11,94	26,66			
45	18,27	40,77		18,27	40,77			
60	23,89	53,32		24,59	54,88			
75	31,61	70,56		30,9	69,0			
90	37,23	83,11		35,01	79,97			
105	44,26	98,79		44,96	100,4			
120	51,28	114,5	114,9	49,88	111,3	113,1	0,0	

L'examen du tableau 30 montre que, dans nos conditions expérimentales, la décarboxylation de l'acide mésoxalique conduit à la formation de quantités stoechiométriques d'anhydride carbonique et d'acide glyoxylique .

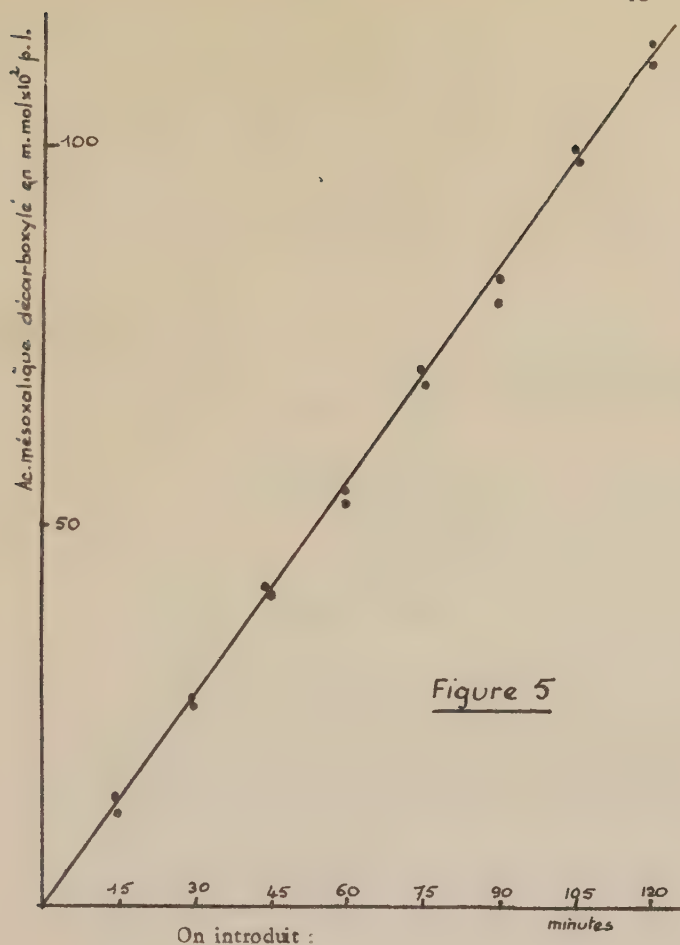


Figure 5

b. Cas de la levure sèche intacte

On ne peut, à l'appareil de WARBURG, étudier la décarboxylation de l'acide mésoxalique par la levure sèche intacte utilisée comme source de catalyseur, à raison de 4 %. En effet, en atmosphère d'azote et dans les conditions de l'expérience précédente T₂, où la levure est simplement mise en suspension dans le tampon, il se produit un dégagement d'anhydride carbonique qui atteint 100 mm³ pour 2 ml. de milieu et en 30 minutes. Aussi, nous nous sommes trouvée dans l'obligation, pour les essais suivants, de ramener la teneur en levure à 2%. Il n'était pas possible d'opérer avec une quantité moindre, le dégagement d'anhydride carbonique, provenant de la décarboxylation du mésoxalate, étant alors trop faible pour pouvoir être apprécié.

Dans la cellule ;

Suspension de levure sèche à 2,5% dans tampon phosphate-ac.citrique de pH 3,0 au 1/2

Tampon de pH 3,0 dilué au 1/2

E

1,6 ml.

T

1,6 ml.

Thermo-
baromètre

0.

2 ml.

Dans l'ampoule latérale :

Mésoxalate de sodium en milieu tamponné*

0,4 ml.

-

-

Tampon de pH 3,0 dilué au 1/2

-

0,4 ml.

-

(Azote, T = 38°)

* La solution de mésoxalate M/10 se prépare de la façon suivante : à 36 mg. de mésoxalate de sodium, on ajoute 1 ml. d'HCl N/10 $\times$ 1,059 et 1 ml. de tampon phosphate-ac.citrique de pH 3,0. Ainsi, lors du retournement, l'apport du mésoxalate ne fait pas varier le pH de la suspension de levure.

Ce n'est qu'après 1 heure d'action que l'on peut juger, avec une approximation acceptable, de la quantité d'anhydride carbonique provenant de la décarboxylation de l'acide mésoxalique. En effet, les dégagements de CO₂ exprimés en mm³ pour 2 ml. de milieu, sont alors, pour E de 107 mm³ (moyenne de 3 essais) et pour T de 97 mm³ (moyenne de 3 essais). Le volume d'anhydride carbonique correspondant à l'acide mésoxalique décarboxylé (E-T) est donc de l'ordre de 10 mm³, soit 22,3 mmol. $\times$ 10² par litre. Le dosage de l'acide glyoxylique (moyenne des 3 essais) conduit à une teneur de 18,1 mg. par litre, soit 24,4 mmol $\times$ 10² par litre.

Malgré la bonne correspondance qui existe entre l'anhydride carbonique dégagé et l'acide glyoxylique formé, cette expérience ne donne pas entière satisfaction, car les différences de volume (E-T) ne sont pas assez marquées, par suite de la quantité insuffisante de levure introduite. Néanmoins, elle montre que la décarboxylation de l'acide mésoxalique n'est pas un phénomène lié à la dénaturation thermique, puisqu'elle est produite par la levure sèche intacte possédant son système zymasique entier.

3 - *Comparaison des valeurs respectives de la méthode de WARBURG et de la méthode à l'acide glyoxylique appliquées à l'étude du processus de décarboxylation de l'acide mésoxalique.*

a - Méthode de WARBURG -

Sur un même essai, on peut déterminer la quantité d'anhydride carbonique dégagé et, en fin d'expérience, doser colorimétriquement, sur la totalité ou sur une partie aliquote du milieu réactionnel, l'acide glyoxylique apparu.

- Les mesures peuvent être effectuées après des temps très courts, ce qui n'est pas réalisable avec la méthode à l'acide glyoxylique, telle que nous l'avons décrite; en effet, comme au temps zéro, on porte directement au thermostat le mélange: solution de mésoxalate + matériel végétal, on ne peut raisonnablement faire de dosages qu'après une heure afin d'éliminer la cause d'erreur due à l'équilibration de la température,
 - La méthode est difficilement applicable quand on utilise la levure sèche comme source de catalyseur; le dégagement d'anhydride carbonique propre à la levure est ici beaucoup trop important par rapport à celui provenant de la décarboxylation du mésoxalate. Par ailleurs, WETZEL ayant signalé que l'acide mésoxalique est un inhibiteur de la décarboxylation de l'acide pyruvique par la levure sèche, la mesure de l'anhydride carbonique (E-T) pourrait ne pas refléter exactement la quantité d'acide mésoxalique décarboxylé. Seule, la méthode basée sur le dosage de l'acide glyoxylique serait alors valable (la levure sèche est sans action sur l'acide glyoxylique) (171).
- Noton que, dans les conditions de nos essais, nous n'avons pas constaté de phénomène d'inhibition.
- Enfin, la méthode de WARBURG est beaucoup moins sensible que la méthode à l'acide glyoxylique.

b - Méthode à l'acide glyoxylique -

Son avantage essentiel est sa très grande sensibilité: elle permet d'apprécier avec certitude 0,5 mg (0,0067 mmol.) d'acide glyoxylique par litre. Comme la détermination s'effectue sur 2 ml., on dose, en fait, 0,001 mg., ce qui correspondrait, au WARBURG, à un dégagement de 0,3 mm³ d'anhydride carbonique.

- La méthode à l'acide glyoxylique reste la méthode de choix pour la détermination des propriétés décarboxylantes des tissus végétaux ou animaux:
 - quand on ne dispose que d'une quantité restreinte de matériel
 - quand l'activité décarboxylante du matériel est peu élevée.

F - ETUDE DE L'ACTION DES EFFECTEURS

I - Action des cations divalents .

Dans les conditions optimales d'action de l'insoluble de levure (mésoxalate de sodium M/50 dans le tampon de pH 2,2, 1% en insoluble de levure, $t = 38^\circ$, durée d'action 2 heures), nous avons étudié l'influence des cations divalents, introduits à l'état de sulfates ou de chlorures, et à la concentration 0,001M, sur le processus de décarboxylation. Les expériences E furent complétées par deux essais témoins, l'un T donnant la quantité d'acide mésoxalique décarboxylé dans les conditions normales, l'autre T₁ permettant de déterminer si les cations seuls possèdent un pouvoir décarboxylant vis-à-vis du cétyldiacide. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 31.

TABLEAU 31

Cations étudiés		Acide mésoxalique décarboxylé en mg. p. litre		Inhibition %
Nature	Concentration	E	T	
Mn ⁺⁺	0,001 M	39,5	44,0	10,2
Mg ⁺⁺	«	35,2	«	20,0
Cu ⁺⁺	«	27,0	«	38,6
Hg ⁺⁺	«	0,0	«	100,0

Les cations envisagés n'ont, par eux-mêmes, aucune action décarboxylante vis-à-vis de l'acide mésoxalique, mais ils possèdent un effet inhibiteur sur la décarboxylation catalysée par l'insoluble de levure. Le pourcentage d'inhibition est variable avec les cations, l'inhibition est totale avec l'ion mercurique.

Nous avons repris, à l'appareil de WARBURG, l'étude de l'inhibition par le chlorure mercurique (mésoxalate M/50 dans le tampon de pH 2,2, insoluble de levure : 4%, $t = 38^\circ$, durée d'action : 1 heure, air). Pour les concentrations M/10.000, M/5.000 et M/1000 en chlorure mercurique, les inhibitions sont respectivement de l'ordre de 1-50 et 100 %.

Le processus de décarboxylation de l'acide mésoxalique se distingue donc de la plupart de ceux catalysés par les cétoacides-carboxylases, enzymes qui requièrent pour leur activité des cations divalents. On sait que l'ion Mg⁺⁺ est un des constituants essentiels de la carboxylase de la levure et que l'ion Mn⁺⁺ est un puissant activateur des β -carboxylases (164,145).

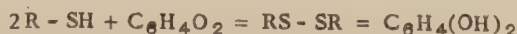
L'inhibition totale que l'on obtient avec l'ion mercurique, permet de supposer que la présence de groupes SH libres, est indispensable pour l'activité du catalyseur⁽¹⁾. Afin de confirmer cette hypothèse, nous

(1) - On retrouve ici une caractéristique de la carboxylase de la levure (9) et aussi de nombreux enzymes d'hydrolyse, d'oxydo-réduction et de transfert (8).

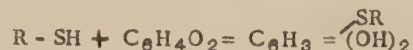
avons étudié l'action de la quinone qui est aussi un inhibiteur des groupes SH.

2 - Action de la quinone -

L'action de la quinone sur les groupes SH peut conduire à deux types de réaction (8):
une oxydation du thiol en disulfure s'accompagnant de la réduction de la quinone en hydroquinone ,



une addition du thiol à la quinone suivant la réaction :



Protocole expérimental - On porte au thermostat à 38°, des milieux répondant aux compositions suivantes :

	E ₁	E ₂	E ₃	T ₁	T ₂	T ₃
Sol. mésoxalate de Na M/ 50 dans le tampon de pH 2,2	10 ml.	10 ml.	10 ml.	-	-	-
Sol. glyoxylate de Ca M/ 1000 dans le tampon de pH 2,2	-	-	-	10 ml.	10 ml.	10 ml.
Insoluble de levure	0,1 g.	0,1 g.	0,1 g.	0,1 g.	-	-
Quinone	-	0,0005M	0,0002M	-	0,0005M	0,0002M
Toluène	0,1 ml.	0,1 ml.	0,1 ml.	0,1 ml.	0,1 ml.	0,1 ml.

Les essais T₂ et T₃ sont destinés à faire connaître l'action éventuelle de la quinone sur l'acide glyoxylique ; T₁ permet, à la fois, de contrôler l'inactivité du catalyseur sur cet acide et de vérifier par dosage le titre de la solution utilisée .

Après 2 heures d'action, on dose l'acide glyoxylique dans chacun des essais; les résultats sont les suivants : la quinone inhibe considérablement la décarboxylation de l'acide mésoxalique, ce qui confirme les résultats obtenus avec l'ion mercurique ; aux concentrations 0,0005 M et 0,0002M en quinone, les pourcentages d'inhibition sont respectivement de 93,2 et de 84,5 % . La quinone est sans action sur l'acide glyoxylique , car les teneurs en cet acide de T₂ et T₃ sont identiques et restent égales à celle de T₁ qui correspond à la quantité initialement présente dans le milieu .

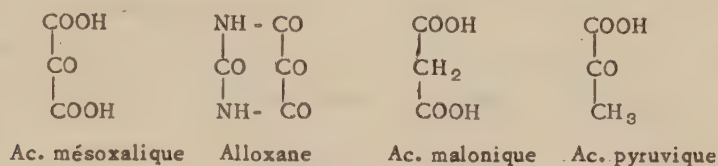
3 - Action de la phénylhydrazine -

Nous avons étudié l'action décarboxylante de l'insoluble de levure en présence de doses croissantes de phénylhydrazine . Après 2 heures et à 38° , l'inhibition est totale pour les molarités égales ou supérieures à celle de l'acide mésoxalique présent dans le milieu, c'est-à-dire pour les concentrations en phénylhydrazine permettant théoriquement le blocage intégral du groupement cétonique . Pour des teneurs inférieures, l'inhibition n'est que partielle : 28% , par exemple, pour une solution M/ 100 d'acide mésoxalique renfermant M/ 1000 de phénylhydrazine .

La phénylhydrazine se comporte donc comme un inhibiteur de substrat ; son action montre que le groupement carbonyle du cétoacide doit être libre pour que la décarboxylation puisse s'effectuer .

4 - Action de l'alloxane et des acides malonique et pyruvique .

Les cations divalents, la quinone, la phénylhydrazine, dont nous venons d'examiner l'influence sur le processus de décarboxylation, agissent en tant qu'inhibiteurs non compétitifs . Nous avons complété cette étude en nous adressant à des substances pouvant se conduire comme des inhibiteurs de compétition . Nous avons retenu l'alloxane ⁽¹⁾, l'acide malonique et l'acide pyruvique .



On fait agir, pendant 2 heures à 38° , sur une solution de mésoxalate de sodium 0,01M dans le tampon de pH 2,2 , en présence de 1g. d'insoluble de levure pour 100 ml., chacun des composés aux concentrations 0,01M et 0,001 M .

L'alloxane, à molarité égale à celle de l'acide mésoxalique, présente un pouvoir inhibiteur notable 33 % . A concentration dix fois plus faible, son action est pratiquement nulle . Un essai témoin, ne renfermant pas d'acide mésoxalique, montre qu'il ne se forme pas d'acide glyoxylique aux dépens de l'uréide mésoxalique .

L'acide malonique est totalement dépourvu d'action inhibitrice, quelle que soit sa concentration . L'étude du comportement de l'acide pyruvique fera l'objet de recherches ultérieures ; en effet, les résultats que nous avons obtenus ne sont pas significatifs car cet acide apporte une cause d'erreur importante dans le dosage colorimétrique de l'acide glyoxylique (voir page 17) .

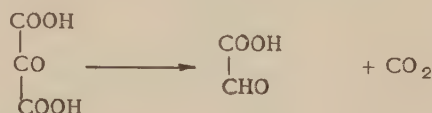
5 - Action de la thiamine et de la cocarboxylase -

La thiamine ainsi que la cocarboxylase (Hoffmann- La Roche) , aux concentrations de 0,001 M , ne modifient en rien la marche du processus de décarboxylation du mésoxalate de sodium M/50 dans le tampon de pH 2,2 par l'insoluble de levure à la concentration de 1g. pour 100 ml. et à 38° .

(¹) . L'alloxane est bien connue pour son action diabétogène (80) ; on pense qu'elle interviendrait en inhibant les groupes thiols indispensables à la synthèse de l'insuline (103, 83) . L'acide mésoxalique (86) et le mésoxalate de sodium (79) ne présentent pas cette propriété . Par ailleurs, on sait que l'alloxane réagit avec le glutathion pour donner un composé d'addition (131) et que cette réaction ne se produit pas avec la cystéine.

G - CONCLUSION

Pour fixer les conditions expérimentales de la décarboxylation de l'acide mésoxalique, nous avons adopté la méthode reposant sur le dosage de l'acide glyoxylique engendré, cette méthode se révélant plus sensible que celle basée sur la mesure du volume d'anhydride carbonique dégagé. Comme source de catalyseur, nous avons retenu, pour des raisons pratiques et de préférence à la levure sèche, la fraction insoluble de la levure obtenue après ébullition. Néanmoins, nos essais nous permettent d'affirmer que la décarboxylation n'est pas un phénomène lié à la dénaturation thermique, puisqu'elle est produite par la levure sèche intacte possédant son système zymasique entier. Nous montrons, par ailleurs, que l'activité décarboxylante de la levure sèche est sensiblement la même que celle de l'insoluble de levure et qu'il se forme, au cours du processus, des quantités stoechiométriques d'acide glyoxylique et d'anhydride carbonique :



L'absence d'une température optimum, d'action, nous a conduit à retenir celle de 38° pour l'ensemble de nos essais. Il est intéressant de noter que l'on obtient à la température du bain-marie bouillant, et en un temps très court, la décarboxylation quantitative du cétoacide par la fraction insoluble de la levure ; c'est là une propriété qui peut être mise à profit pour la caractérisation de l'acide mésoxalique chez les êtres vivants.

La décarboxylation s'effectue au pH optimum de 2,4 pour une teneur en mésoxalate de M/500, et c'est avec le tampon phosphate-acide citrique qu'elle est la plus marquée. L'étude de l'influence de la concentration en substrat montre que la vitesse limite de transformation est atteinte pour M/50, on observe, dans ce cas, un déplacement de l'optimum de pH et l'existence d'une zone (pH 3,0 à 3,8) où l'importance de la décarboxylation reste la même. Pour les pH plus élevés, les pourcentages de transformation diminuent rapidement et sont négligeables à pH 5,8.

Ces résultats nous amènent à des conclusions différentes de celles de WETZEL (171). Cet auteur, qui a étudié la décarboxylation de l'acide mésoxalique par la levure sèche, dans les conditions d'action de la carboxylase de NEUBERG, assure que la levure est incapable de décarboxyler le cétoacide. Nous montrons qu'il en est autrement et que le catalyseur de décarboxylation, présent chez *Saccharomyces cerevisiae*, se distingue de l'enzyme de NEUBERG :

- par sa thermostabilité : un séjour prolongé à la température de l'ébullition ne détruit pas le catalyseur,
- par son pH optimum d'action : la décarboxylation se manifeste dans une zone de pH (3 à 3,8) où l' α -carboxylase est pratiquement sans action.

L'étude de l'action des effecteurs montre que les métaux divalents ne concourent pas à augmenter l'activité du catalyseur, ainsi qu'on le constate pour les β -carboxylases. Elle fait aussi apparaître que les

groupes thiols sont nécessaires pour l'activité décarboxylante ; en effet, l'ion mercurique inhibe totalement la décarboxylation . Toutefois, une légère réserve doit être formulée à ce sujet , car les sels mercuriques sont susceptibles de se combiner, non seulement aux SH , mais aussi aux groupes carboxyles et aminés des protéides (70). L'inhibition par la quinone, qui ne présente pas ces inconvénients, apporte une preuve supplémentaire de l'intervention des groupes thiols dans le processus de décarboxylation ; les résultats obtenus par action de l'alloxane, uréide dont on connaît le caractère thioloпрive, confirment encore cette manière de voir. Enfin, l'inhibition produite par la phénylhydrazine prouve que le groupe carbonyle du cétodiacide doit être libre pour que l'action décarboxylante puisse se manifester .



CHAPITRE IV

NATURE DU GROUPE ACTIF DU CATALYSEUR DE DECARBOXYLATION ET HYPOTHESE SUR LE MECANISME D'ACTION

	<i>Pages</i>
<i>A - ETUDE DE L'ACTION DE QUELQUES DERIVES THIOLS SUR L'ACIDE MESOXALIQUE (Glutathion , cystéine, acide thiomalique)</i>	<i>55</i>
<i>B - L'ACIDE THIOMALIQUE , MODELE DE CARBOXYLASE</i>	<i>58</i>
<i>C - CONCLUSIONS</i>	<i>63</i>

NATURE DU GROUPE ACTIF DU CATALYSEUR DE DECARBOXYLATION ET HYPOTHESE SUR LE MECANISME D'ACTION

L'étude de l'action des effecteurs nous a amenée à conclure que les groupes thiols sont indispensables à la réalisation du processus de décarboxylation, encore faut-il que le groupe carbonyle de l'acide mésoxalique soit libre. Ces données suggèrent que la décarboxylation pourrait être précédée de la formation d'un composé intermédiaire d'addition entre le substrat et les groupes SH du catalyseur. L'inhibition produite par l'alloxane paraît confirmer cette manière de voir car, dans nos conditions expérimentales, le groupement carbonyle de l'urée en position 5, garde ses propriétés de cétone et peut conduire à la formation d'une mercaptone. L'acide de malonique, qui possède un groupe méthylène en position α , n'intervient par contre en aucune façon dans le processus ⁽¹⁾. Il nous a alors paru intéressant, pour préciser la nature du phénomène, de rechercher si des composés thiols de bas poids moléculaire présentaient une action décarboxylante vis-à-vis de l'acide mésoxalique.

A - ETUDE DE L'ACTION DE QUELQUES DERIVES THIOLS SUR L'ACIDE MESOXALIQUE

Nous avons étudié le comportement de l'acide mésoxalique en présence du glutathion, de ses constituants pris séparément et de l'acide thiomalique. Nous avons fait agir, sur une solution M/50 de mésoxalate de sodium dans le tampon phosphate-acide citrique de pH 2,2, chacun de ces composés à la concentration M/200. Les résultats obtenus par dosage de l'acide glyoxylique engendré sont consignés dans le tableau 32 et ont servi à tracer les courbes de la fig. 6

TABLEAU 32

Substances étudiées	pH des essais	Acide mésoxalique décarboxylé en mg. par litre					
		1h.	2h.	3h.	5h.	7h.	9h.
Glutathion	2,9	27,1	54,7	79,2	134	174	211
1 (-) Cystéine, HCl	2,9	88,4	145	178	192	203	201
Glycocolle	2,9	0	0	0	0	0	0
Ac. d- Glutamique	2,9	0	0	0	0	0	0
Ac. thiomalique	2,9	58,8	109	158	239	313	364

(1) Si l'acide malonique inhibe fortement la succinodéshydrogénase, riche en SH essentiels pour son activité (135, 134, 111) l'étude du mécanisme de l'inhibition a montré que l'acide malonique n'interfère pas dans ce cas, directement avec les groupes sulfhydrylés (133)

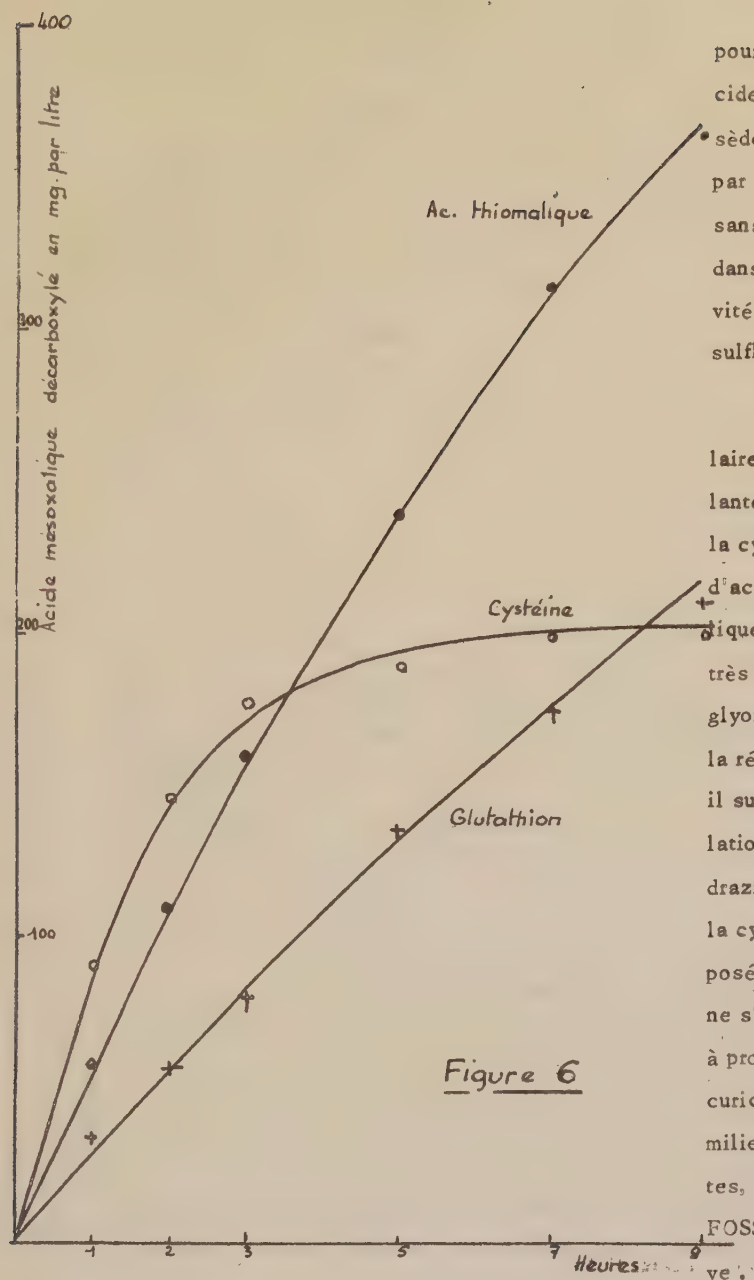


Figure 6

Le glutathion décarboxyle l'acide mésoxalique pour donner de l'acide glyoxylique, et seule parmi les acides aminés entrant dans sa constitution, la cystéine possède la même propriété. L'action catalytique présentée par l'acide thiomalique⁽¹⁾ permet, d'une part, d'éliminer sans ambiguïté une participation « directe » des groupes NH_2 dans le phénomène et, d'autre part, de préciser que l'activité décarboxylante se rattache uniquement à la fonction sulphydrilée.

Au même pH d'action et à concentration moléculaire égale, le glutathion montre une activité décarboxylante inférieure à celle de l'acide thiomalique, mais c'est la cystéine qui, tout au moins pendant les premiers temps d'action, décarboxyle le plus activement l'acide mésoxalique. Le comportement de cet amino-acide est d'ailleurs très particulier; aussi, après 6 heures, la teneur en acide glyoxylique n'augmente plus et sa recherche, à froid, par la réaction colorée phénylhydrazinique est négative. Faut-il supposer que l'acide glyoxylique, engendré par décarboxylation à 38° , reste lié à la cystéine et que la phénylhydrazine ne peut déplacer la combinaison à froid, ou bien la cystéine donne-t-elle avec l'acide mésoxalique, un composé d'addition, stable à 38° , et dont la décarboxylation ne s'effectue qu'à la température d'ébullition? Mettant à profit l'affinité marquée des groupes SH pour l'ion mercurique, nous avons traité à froid une partie aliquote du milieu par le chlorure mercurique; après quelques minutes, nous avons effectué à froid la réaction de SCHRYVER FOSSE: la recherche de l'acide glyoxylique a été positive.

Cette expérience montre que la décarboxylation de l'acide mésoxalique par la cystéine a bien lieu à 38° et que l'acide glyoxylique engendré doit rester combiné à l'acide-amino sous la forme d'un semimercaptal⁽²⁾

⁽¹⁾ L'acide thioglycolique et le BAL (Dimercaptopropanol) possèdent des propriétés identiques. La l-cystine, la dl-cystine et la méthionine qui ne présentent pas de groupes SH libres sont totalement dépourvues d'action décarboxylante.

⁽²⁾ On sait que les aldéhydes possèdent la propriété de se combiner d'une façon réversible aux thiols pour donner des semimercaptals: $\text{RSH} + \text{R}'\text{CHO} \rightleftharpoons \text{R}'\text{CHOH.SR}$ (104, 137)

stable à la température ordinaire, instable à celle de l'ébullition, en présence de phénylhydrazine et déplaçable à froid par le mercure mais non par la phénylhydrazine .

Afin de confirmer les résultats ci-dessus, nous avons étudié qualitativement , à 38° , l'influence de la concentration en cystéine sur la décarboxylation du mésoxalate en solution dans le tampon phosphate-acide citrique de pH 2,2 . La recherche de l'acide glyoxylique a été effectuée, après neutralisation, à froid, en présence et en l'absence de chlorure mercurique et à l'ébullition. A 2 ml. de la solution neutralisée, on ajoute ou non 0,05 ml. d'une solution saturée de chlorure mercurique , puis 0,1 ml. de solution de chlorhydrate de phénylhydrazine à 4 %; on attend 2 minutes , on ajoute 1,2 ml. d'acide chlorhydrique concentré et 0,1 ml. de solution de ferricyanure de potassium à 10 % . Par ailleurs, sur 2 ml. de la solution neutralisée, on effectue la réaction colorée comme d'ordinaire après un séjour de 2 minutes au bain-marie bouillant . Les résultats figurent dans le tableau 33 .

TABEAU 33

Teneur en Cystéine	Recherche de l'acide glyoxylique après 6 heures d'action					
	Milieu non dilué			Milieu dilué (conditions du dosage, Dil.25)		
	à froid	à froid + HgCl ₂	à l'ébullit.	à froid	à froid+HgCl ₂	à l'ébullit.
M/ 100	+	5 +	5 +	-	2 +	2 + soit 1,25 mg%
M/ 500	+ faible	3 +	3 +	-	+	+ « 0,59mg%
M/ 2500	traces	2 +	2 +	-	traces	traces, 0,18mg%

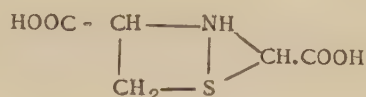
La recherche à froid de l'acide glyoxylique dans le milieu non dilué et après des temps variables (à 6 heures) , montre que la teneur en acide glyoxylique augmente en fonction des concentrations croissantes en cystéine et du temps. Toutefois, la plus grande partie échappe à la caractérisation , comme le précisent les essais, à froid en présence de chlorure mercurique ou après ébullition avec la phénylhydrazine . Après 6 heures d'action, si on opère sur le milieu dilué dans les conditions du dosage de l'acide glyoxylique, la recherche à froid est négative , ce qui laisse sous-entendre que la teneur en acide glyoxylique libre est inférieure à 0,05mg. par litre, alors que le dosage conduit aux teneurs respectives de 1,25 , 0,59 et 0,18 mg. par litre .

Après 50 heures, la recherche de l'acide glyoxylique à froid, dans le milieu non dilué , est négative pour l'expérience où la concentration en cystéine est cinq fois plus élevée que celle du substrat ; elle reste positive pour les concentrations égales ou inférieures . On peut donc admettre qu'il existe un équilibre du type :



l'excès de cystéine favorisant la formation du semimercaptal ; l'addition de chlorure mercurique détruit cet équilibre et libère l'acide glyoxylique qui devient caractérisable à froid dans le milieu .

L'action de la cystéine sur l'acide glyoxylique peut encore être plus complexe ; rien ne s'oppose à la cyclisation du semimercaptal avec formation de la thiazolidine correspondante ⁽¹⁾ :



nous avons constaté, en effet, qu'à pH 2,2, à 38°, et en fonction du temps, l'acide glyoxylique mis en présence de cystéine disparaît.

B - L'ACIDE THIOMALIQUE, MODELE DE CARBOXYLASE

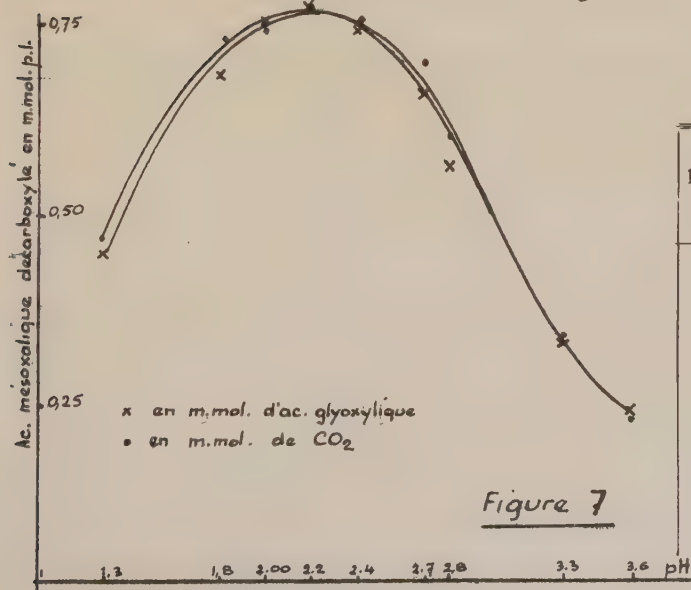
Les conditions expérimentales de la décarboxylation de l'acide mésoxalique par l'acide thiomalique, ont été déterminées en utilisant, soit la technique de WARBURG, soit la méthode de dosage de l'acide glyoxylique, soit encore et simultanément les deux procédés analytiques.

1 - Détermination du pH optimum d'action -

Nous avons retenu le tampon citrate-acide chlorhydrique de SÖRENSEN, les concentrations M/50 en mésoxalate et M/200 en acide thiomalique. Les essais, d'une durée égale à 2 heures, sont effectués à la température de 38° à l'appareil de WARBURG. Après la dernière lecture manométrique, on retire les fioles du bain et on dose l'acide glyoxylique dans les différents essais.

Protocole expérimental : Fiole de WARBURG : 1,6 ml. de solution tampon de pH variable renfermant 7,2 mg. de mésoxalate de sodium. Ampoule latérale : 0,4 ml. d'eau renfermant 1,5 mg. d'acide thiomalique (air).

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 34 ; ils ont servi à tracer les courbes de la figure 7.



TABEAU 34

pH des essais	Ac. mésoxalique décarboxylé par l. en	
	mmol. de CO ₂	mmol. d'acide glyoxylique
1,3	0,473	0,412
1,8	0,727	0,676
2,0	0,743	0,755
2,2	0,772	0,774
2,4	0,750	0,740
2,7	0,699	0,666
2,8	0,603	0,561
3,3	0,342	0,338
3,6	0,229	0,234

(1) - Le fait a déjà été signalé pour l'acide pyruvique (acide méthylglyoxylique) (142,37)

Quelle que soit la valeur du pH des essais, il se forme des quantités stoechiométriques d'anhydride carbonique et d'acide glyoxylique ; les méthodes de dosage, manométrique et colorimétrique peuvent donc être employées indifféremment,

La décarboxylation de l'acide mésoxalique est maximum dans la zone des pH compris entre 2,0 et 2,4 ; nous retiendrons comme pH , pour les déterminations qui vont suivre, le pH de 2,2 .

2 - Influence de la concentration en substrat sur le processus de décarboxylation.

On fait agir, à 38°, pendant 2 heures et à pH 2,2, l'acide thiomalique M/200 sur des solutions de mésoxalate de sodium de concentrations croissantes. Pour les teneurs en mésoxalate inférieures à M/50, les quantités d'anhydride carbonique dégagées sont trop faibles pour pouvoir être mesurées avec la précision désirable; aussi, les déterminations reposent-elles sur le dosage colorimétrique de l'acide glyoxylique engendré. Par contre, pour les teneurs en substrat, supérieures à M/50, nous avons retenu, de préférence, la méthode manométrique. En effet, pour les milieux riches en mésoxalate, la technique colorimétrique n'est applicable qu'après dilution des essais dans de fortes proportions, ce qui diminue la précision des résultats. Enfin, pour la concentration M/50 en substrat, les deux techniques analytiques conviennent; nous les avons utilisées simultanément pour apprécier l'importance de la décarboxylation.

Protocole expérimental : *Firole de WARBURG* : 1,6 ml. de solution tamponnée de mésoxalate de sodium de titre variable.

Ampoule latérale : 0,4 ml. d'eau renfermant 1,5 mg. d'acide thiomalique
(pH des essais: 2,2 ; air).

Les résultats figurent dans le tableau 35 (figure 8)

TABLEAU 35

Concentration en substrat		Acide mésoxalique décarboxylé par litre				Vitesse (mmol. d'ac. méso- xalique décarboxy- lé par heure)
en mg %	en mol.	en mg.		en mmol.		
		(1)	(2)	(1)	(2)	
720	M/ 200	20,9		0,154		0,077
1.360	M/ 100	42,7		0,314		0,154
2.720	M/ 50	101,1	104,1	0,743	0,766	0,371- 0,383
5.440	M/ 25		165,7		1,220	0,610
13600	M/ 10		261,1		1,920	0,960
18.133	M/ 7,5		291,5		2,143	1,071
27.200	M/ 5		299,9		2,205	1,102

(1) par dosage de l'acide glyoxylique
(2) par mesure du volume de CO₂

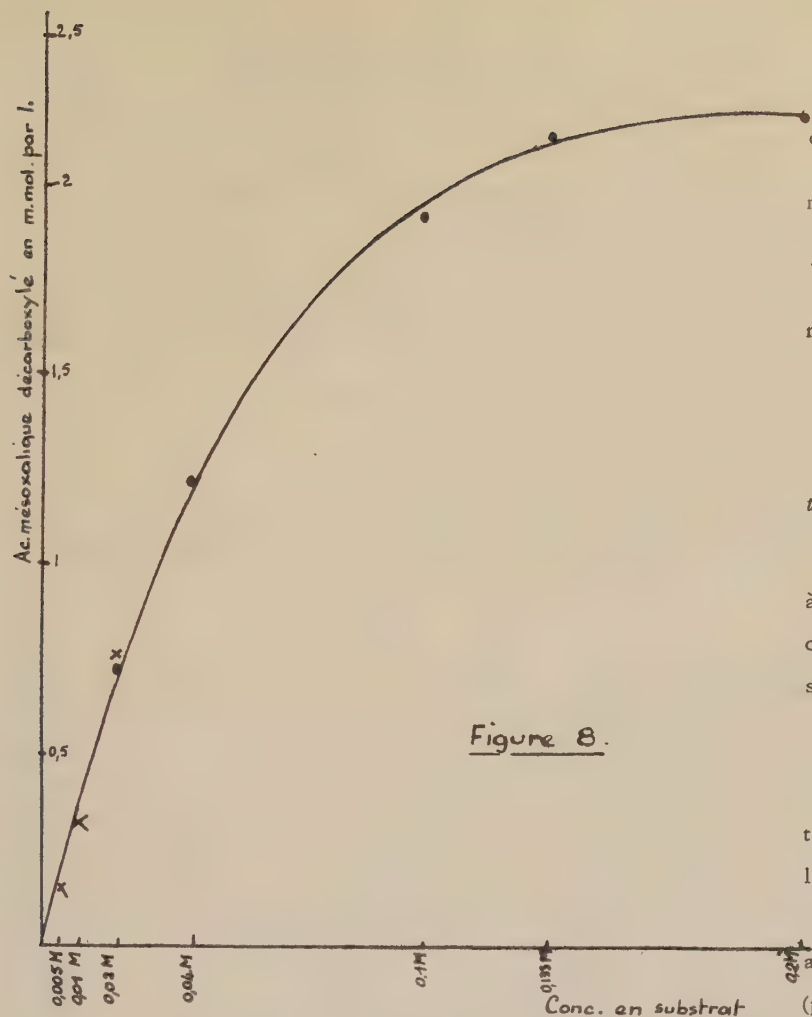


Figure 8.

A 38° et au pH de 2,2, on constate que la vitesse de décarboxylation de l'acide mésoxalique par l'acide thiomalique tend vers une valeur limite atteinte pour une teneur en substrat au moins égale à M/7,5.

3 - Influence de la concentration en catalyseur sur le processus de décarboxylation.

On fait agir, à 38°, pendant une heure et à pH 2,2, l'acide thiomalique, pris à des concentrations variables, sur le mésoxalate de sodium.

Protocole expérimental :

Fiolle de WARBURG : 1,6 ml. de solution tamponnée renfermant 48 mg. de mésoxalate de sodium.

Ampoule latérale : 0,4 ml. de solution aqueuse d'acide thiomalique de titre variable (pH des essais 2,2 ; air).

Après une heure d'action, les quantités d'acide mésoxalique décarboxylé, calculées d'après les volumes d'anhydride carbonique dégagé, sont indiquées dans le tableau 36 (fig. 9).

TABEAU 36

Concentrations en ac. thiomalique	Ac. mésoxalique décarboxylé en mmol. par litre	
	1er essai	2ème essai
M/ 500	0,49	0,47
M/ 350	0,69	0,74
M/ 200	1,18	1,14
M/ 150	1,52	1,49
M/ 100	2,19	2,21
M/ 50	4,46	4,48

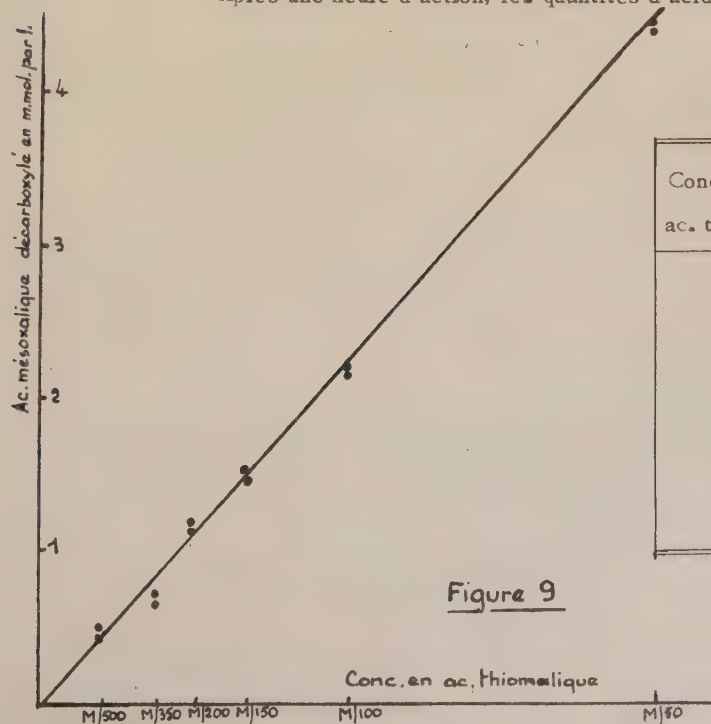


Figure 9

La décarboxylation de l'acide mésoxalique par l'acide thiomalique est proportionnelle à la concentration en catalyseur ,

4 - Etude du processus de décarboxylation en fonction du temps .

Les déterminations ont été effectuées à 38° , à pH 2,2 , et avec des concentrations respectivement égales à M/7,5 en mésoxalate de sodium et M/ 100 en acide thiomalique .

Protocole expérimental - *FiOLE de WARBURG* : 1,6 ml. de solution tamponnée renfermant 48 mg. de mésoxalate de sodium.

Ampoule latérale : 0,4 ml. d'eau renfermant 3 mg. d'acide thiomalique (pH des essais : 2,2 ; air).

Les quantités d'acide mésoxalique décarboxylé, après 1 heure, calculées d'après les volumes d'acide carbonique dégagé, sont indiquées dans le tableau 37 (fig. 10)

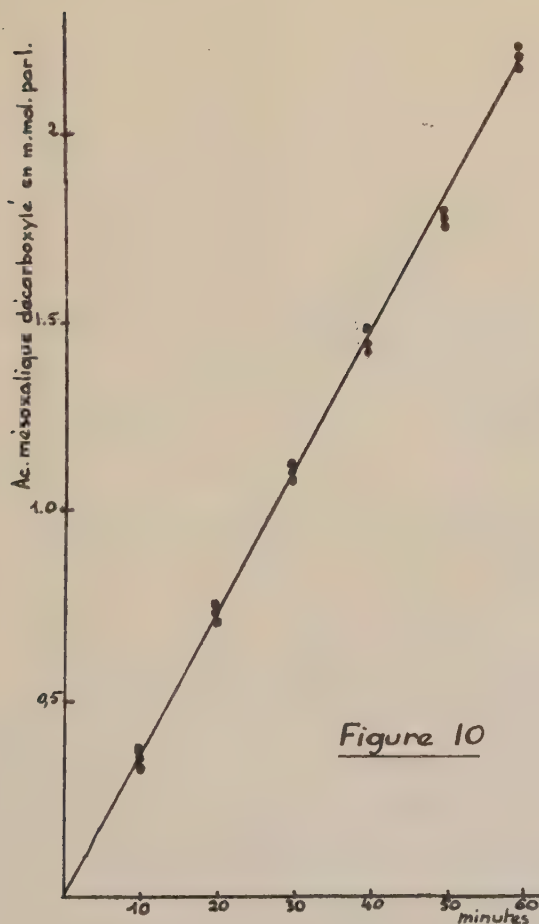


Figure 10

TABEAU 37

Temps en minutes	Ac. mésoxalique décarboxylé en mmol. par litre		
	1er essai	2ème essai	3ème essai
0' à 10'	0,333	0,365	0,389
10' à 20'	0,425	0,370	0,328
20' à 30'	0,338	0,392	0,344
30' à 40'	0,392	0,342	0,386
40' à 50'	0,298	0,338	0,385
50' à 60'	0,400	0,410	0,397
en 60'	2,186	2,217	2,229

Dans les conditions retenues, il disparaît, en des temps égaux, des quantités égales d'acide mésoxalique. Après une heure d'action, la décarboxylation intéresse respectivement pour les trois essais : 2,19-2,22-2,23 millimolécules de l'acide mésoxalique mis en expérience.

5 - Influence de la température sur le processus de décarboxylation .

La décarboxylation de l'acide mésoxalique par l'acide thiomalique a été mesurée aux températures de 25, 30, 35, 38, 40 et 45°

Protocole expérimental - *FiOLE de WARBURG* : 1,6 ml. de solution tamponnée renfermant 48 mg. de mésoxalate de sodium.

Ampoule latérale : 0,4 ml. d'eau renfermant 3,0 mg. d'acide thiomalique

(pH des essais : 2,2 ; air et azote) ,

Les résultats obtenus après une heure d'action figurent dans le tableau 38 (fig. 11)

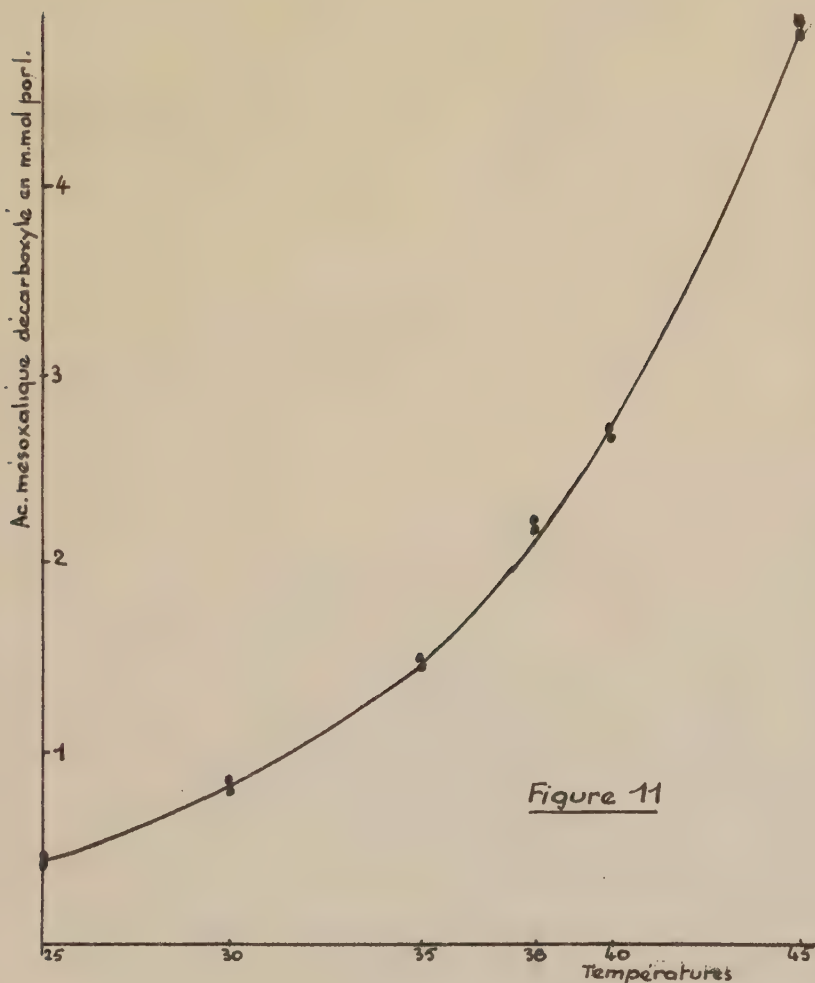


TABLEAU 38

Températures	Ac. mésoxalique décarboxylé en mmol. par litre	
	1er essai	2ème essai
25°	0,457 (air)	0,435 (air)
30	0,804 «	0,871 «
35	1,476 «	1,523 (azote)
38	2,217 «	2,229 (air)
40	2,679 «	2,723 «
45	4,826 «	4,931 (azote)

La vitesse de décarboxylation croît en fonction de la température; pour celles comprises entre 25 et 45°, la valeur du Q_{10} est voisine de 3,2, comme l'indiquent les données ci-après :

de 25 à 35° (air)	$Q_{10} = 3,23$
« 30 à 40° «	$Q_{10} = 3,15$
« 35 à 45° «	$Q_{10} = 3,27$
« 35 à 45° (azote)	$Q_{10} = 3,24$

Pour les températures considérées, les quantités d'acide mésoxalique décarboxylé sont identiques, que l'on opère en présence d'air ou en atmosphère d'azote .

6 - Action du chlorure mercurique sur le processus de décarboxylation .

Nous avons étudié l'action du chlorure mercurique aux concentrations M/ 100.000 , M/ 10.000 , M/ 1.000 , M/ 500 , M/ 200 et M/ 100 sur la décarboxylation , à pH 2,2 et à 38° , d'une solution M/7,5' en mésoxalate par l'acide thiomalique M/ 100 .

Protocole expérimental - *Firole de WARBURG* : 1,6 ml. de solution tamponnée renfermant 48 mg. de mésoxalate de sodium.

Ampoule latérale : 0,2 ml. d'eau renfermant 3 mg. d'acide thiomalique et 0,2 ml. de solution aqueuse de chlorure mercurique de titre variable

(pH des essais 2,2 ; air)

Les pourcentages d'inhibition observés après une heure d'action figurent dans le tableau 39 :

TABLEAU 39

Concentration en HgCl_2	Inhibition %
M/ 100.000	0
M/ 10.000	0
M/ 1.000	7
M/ 500	59,0
M/ 200	100,0
M/ 100	100,0

L'inhibition complète s'observe pour les quantités de chlorure mercurique permettant le blocage intégral du groupe sulphydryle de l'acide thiomalique.

G - CONCLUSIONS

Avant d'envisager le cas de l'acide mésoxalique, il est intéressant de rappeler les conceptions actuelles concernant les mécanismes de la décarboxylation (129) des acides cétoniques. Des différentes hypothèses émises, celle de WEIL-MALHERBE (169), qui se rapporte plus spécialement aux α -cétoacides, met en jeu le radical NH_2 de la diphosphothiamine, en tant que groupe actif. Pour les décarboxylations oxydatives, l'action catalytique serait complétée, d'après LIPMANN (106), par l'intervention de l'azote quaternaire du groupe thiazol qui agirait en tant que transporteur d'électrons. Le rôle supposé du radical amino dans la décarboxylation des α -cétoacides est une illustration des recherches classiques de LANGENBECK (100, 101, 101 bis, 147) sur les « modèles d'enzymes », c'est-à-dire sur les propriétés et le mécanisme d'action de certains composés organiques de faible poids moléculaire - le 3-amino- α -naphtoxindol dans le cas du modèle carboxylasique - qui se comportent comme les macromolécules catalytiques élaborées par la cellule vivante. Enfin, dans le cas des β -cétoacides, c'est l'ion métal qui aurait une action catalytique en complexant le carboxyle adjacent au carbonyle (146, 78, 76).

Dans le cas de l'acide mésoxalique, il n'est pas possible d'attribuer une fonction primordiale au groupe amino. La mise en évidence des propriétés décarboxylantes du dimercaptopropanol, des acides thioglycolique et thiomalique, le comportement du glutathion et de ses constituants pris séparément, montrent que le groupe thiol est directement responsable du phénomène. On peut se demander si la facilité avec laquelle l'acide mésoxalique se décarboxyle sous l'influence des composés sulphydrylés n'est pas en rapport avec la configuration particulière de sa molécule ? En effet, si les groupes thiols sont indispensables au fonctionnement de l' α -carboxylase, ils ne peuvent, par eux-mêmes, provoquer les décarboxylations catalysées par cet enzyme ; cependant, on peut supposer qu'ils ne seraient pas étrangers à la création d'une liaison enzyme-substrat, CAVALLINI (37) ayant montré que la décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique est causée par le glutathion, en présence du cytochrome C et de la cytochrome-oxydase ou des ions cuivriques.

(pH des essais 2,2 ; air)

Les pourcentages d'inhibition observés après une heure d'action figurent dans le tableau 39 :

TABLEAU 39

Concentration en HgCl_2	Inhibition %
M/ 100.000	0
M/ 10.000	0
M/ 1.000	7
M/ 500	59,0
M/ 200	100,0
M/ 100	100,0

L'inhibition complète s'observe pour les quantités de chlorure mercurique permettant le blocage intégral du groupe sulphydryle de l'acide thiomalique.

G - CONCLUSIONS

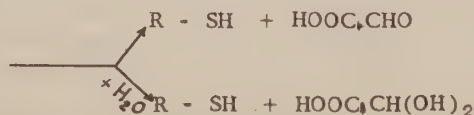
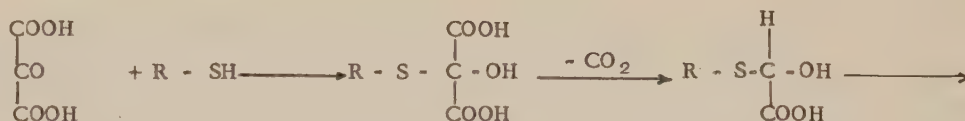
Avant d'envisager le cas de l'acide mésoxalique, il est intéressant de rappeler les conceptions actuelles concernant les mécanismes de la décarboxylation (129) des acides cétoniques. Des différentes hypothèses émises, celle de WEIL-MALHERBE (169), qui se rapporte plus spécialement aux α -cétoacides, met en jeu le radical NH_2 de la diphosphothiamine, en tant que groupe actif. Pour les décarboxylations oxydatives, l'action catalytique serait complétée, d'après LIPMANN (106), par l'intervention de l'azote quaternaire du groupe thiazol qui agirait en tant que transporteur d'électrons. Le rôle supposé du radical amino dans la décarboxylation des α -cétoacides est une illustration des recherches classiques de LANGENBECK (100, 101, 101 bis, 147) sur les « modèles d'enzymes », c'est-à-dire sur les propriétés et le mécanisme d'action de certains composés organiques de faible poids moléculaire - le 3-amino- α -naphtoxindol dans le cas du modèle carboxylasique - qui se comportent comme les macromolécules catalytiques élaborées par la cellule vivante. Enfin, dans le cas des β -cétoacides, c'est l'ion métal qui aurait une action catalytique en complexant le carboxyle adjacent au carbonyle (146, 78, 76).

Dans le cas de l'acide mésoxalique, il n'est pas possible d'attribuer une fonction primordiale au groupe amino. La mise en évidence des propriétés décarboxylantes du dimercaptopropanol, des acides thioglycolique et thiomalique, le comportement du glutathion et de ses constituants pris séparément, montrent que le groupe thiol est directement responsable du phénomène. On peut se demander si la facilité avec laquelle l'acide mésoxalique se décarboxyle sous l'influence des composés sulphydrylés n'est pas en rapport avec la configuration particulière de sa molécule ? En effet, si les groupes thiols sont indispensables au fonctionnement de l' α -carboxylase, ils ne peuvent, par eux-mêmes, provoquer les décarboxylations catalysées par cet enzyme ; cependant, on peut supposer qu'ils ne seraient pas étrangers à la création d'une liaison enzyme-substrat, CAVALLINI (37) ayant montré que la décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique est causée par le glutathion, en présence du cytochrome C et de la cytochrome-oxydase ou des ions cuivriques.

L'acide thiomalique, dont nous avons approfondi l'étude en tant que catalyseur de décarboxylation, fournit l'exemple d'un modèle nouveau de carboxylase. Le pH optimum de décarboxylation est de 2,2 et quelle que soit la valeur du pH, il se forme des quantités stœchiométriques d'acide glyoxylique et d'anhydride carbonique. Enfin, dans les conditions où la concentration en substrat est telle que la vitesse limite de transformation est pratiquement atteinte (M/7,5 en mésoxalate), la décarboxylation, en fonction du temps, est une réaction d'ordre nul.

La décarboxylation de l'acide mésoxalique par la cystéine ne peut être comparée à celle provoquée par l'acide thiomalique ou par le glutathion. Avec ces deux derniers dérivés, l'acide glyoxylique se retrouve à l'état libre dans le milieu et peut être directement caractérisé à froid. Avec la cystéine, la mise en évidence à froid de l'acide glyoxylique n'est possible qu'après addition de chlorure mercurique, ce qui tend à prouver que l'acide glyoxylique resterait combiné sous la forme probable d'un semimercaptal, dont l'origine serait la semimercaptone mésoxalique.

Ces données permettent de concevoir le mécanisme de la décarboxylation de l'acide mésoxalique : formation d'une semimercaptone instable résultant de la combinaison catalyseur-substrat, puis perte d'une molécule d'anhydride carbonique conduisant au semimercaptal de l'acide glyoxylique qui, par simple scission avec réarrangement moléculaire ou sous l'influence de l'eau, régénérerait le catalyseur avec mise en liberté de l'acide glyoxylique.



Enfin, l'étude de l'action des composés thiols sur l'acide mésoxalique fait apparaître une propriété, jusqu'alors inconnue, de la fonction sulphydrylée : celle de catalyseur de décarboxylation. Elle conduit à regarder l'acide mésoxalique comme un nouveau réactif des groupes thiols présentant la propriété de ne mettre en jeu qu'un seul groupe thiol.



CHAPITRE V

COMPORTEMENT DU GLUTATHION ET DE QUELQUES THIOLS-PROTEINES VIS-A-VIS DE L'ACIDE MESOXALIQUE

	Pages
<i>A - GLUTATHION</i>	65
1 - Propriétés décarboxylantes en fonction du pH	65
2 - Propriétés décarboxylantes en fonction de la température	66
3 - Conclusion	67
<i>B - UREASE, PAPAINASE, EDESTINE</i>	68
1 - Généralités	68
2 - Préparations d'uréase, de papainase et d'édestine	68
3 - Mise en évidence des propriétés décarboxylantes des thiols-protéines.....	69
<i>a - Uréase</i>	69
<i>b - Papainase</i>	70
<i>c - Edestine</i>	70
4 - Action de composés susceptibles d'avoir un rôle activateur	71
<i>a - Essais d'activation par la cystéine et le glutathion</i>	72
<i>b - Essais d'activation par l'acide cyanhydrique</i>	72
5 - Conclusion	76
<i>C - CONCLUSIONS</i>	77

COMPORTEMENT DU GLUTATHION ET DE QUELQUES THIOLS -PROTEINES

VIS-À-VIS DE L'ACIDE MESOXALIQUE

La présence chez *Saccharomyces cerevisiae* d'un catalyseur de décarboxylation thermostable, la participation directe du radical thiol dans le processus de décarboxylation, nous ont amenée à examiner l'action (32), vis-à-vis de l'acide mésoxalique, de protéines douées de propriétés catalytiques définies et pour lesquelles les groupes thiols se sont révélés indispensables : uréase et papainase. En plus de ces deux hydrolases, nous avons retenu l'édestine, globuline dont la teneur en SH est élevée.

Nous avons fait précéder cette étude de quelques déterminations portant sur le glutathion, en raison de la répartition universelle de ce tripeptide dans l'cellule vivante et de la multiplicité de ses fonctions biologiques (rôles de protection, d'activation, d'inactivation ..) (19, 22, 63). Il ne s'agit d'ailleurs que d'essais limités, réalisés dans le but de préciser le comportement de ce thiol dans des conditions d'action analogues à celles de la levure.

A - GLUTATHION

1 - Propriétés décarboxylantes du glutathion en fonction du pH.

On fait agir, à 38°, sur une solution de mésoxalate de sodium M/50 dans le tampon phosphate-acide citrique, le glutathion à la concentration M/200. Les résultats obtenus après 2 heures, en se basant sur le dosage de l'acide glyoxylique engendré par décarboxylation, figurent dans le tableau 40.

TABEAU 40

pH des essais	Acide mésoxalique décarboxylé en mg. par litre
2,9	50,1
3,1	45,5
3,4	34,0
3,7	26,0
4,0	20,7
4,3	10,6
4,6	4,5
5,0	traces

L'activité décarboxylante du glutathion décroît quand on s'élève dans la zone des pH. A ce point de vue, le tripeptide se comporte comme l'insoluble de levure et l'acide thiomalique. La valeur de ces résultats a été confirmée en établissant que le glutathion ne possède aucune action sur l'acide glyoxylique dans la zone de pH considérée.

2 - *Propriétés décarboxylantes du glutathion en fonction de la température (comparaison avec l'insoluble de levure et la cystéine) .*

En solution aqueuse, le glutathion s'hydrolyse déjà à 47°, et plus rapidement pour des températures supérieures, en acide glutamique et cystéinylglycocolle. L'acide glutamique peut facilement se cycliser en acide pyrrolidone-carbonique et la cystéinylglycine donne naissance en plus de la dicétopipérazine correspondante, à une série de produits, non encore identifiés, avec dégagement d'hydrogène sulfuré (18). Ayant montré qu'une des principales caractéristiques du catalyseur de la levure est sa thermostabilité, il importait de connaître si le glutathion soumis à l'action de la chaleur conservait ses propriétés décarboxylantes .

a - Action sur l'acide mésoxalique du glutathion porté, au préalable, à la température de l'ébullition .

On fait agir, à 38°, sur une solution de mésoxalate de sodium M/ 50, dans le tampon phosphate-acide citrique de pH 2,2, le glutathion à la concentration M/ 200, les solutions aqueuses du tripeptide ayant supporté des séjours de 15, 30 et 60 minutes au bain-marie bouillant. Le tableau 41 donne les quantités d'acide mésoxalique décarboxylé en fonction du temps, ainsi que les résultats obtenus dans les conditions normales avec le glutathion et la cystéine à concentrations moléculaires identiques .

TABEAU 41

Substances étudiées	Ac. mésoxalique décarboxylé en mg par litre		
	1 h.	2 h.	3 h.
Glutathion M/ 200	27,1	54,7	80,8
« « , porté 15' à 100°	49,6	79,0	97,4
« « , « 30' à 100°	79,0	111,2	121,3
« « , « 60' à 100°	104,8	150,7	154,4
Cystéine M/ 200	88,4	144,6	178,1

Le traitement préalable du glutathion par la chaleur exalte ses propriétés décarboxylantes et les transformations sont d'autant plus élevées que la durée du traitement à 100° a été plus prolongée. On peut penser que l'augmentation de l'activité décarboxylante est due aux produits de décomposition de poids moléculaire plus faible que l'on sait apparaître dans ces conditions : Cystéinylglycine et sa dicétopipérazine.

b - Action décarboxylante du glutathion à la température de l'ébullition .

On porte au bain-marie bouillant, des milieux renfermant le mésoxalate de sodium à la concentration M/ 1000 dans le tampon phosphate-acide citrique de pH 2,2, les dérivés thiols à la concentration M/ 500 et l'insoluble de levure à raison de 1%. Après des temps variables, on dose l'acide glyoxylique engendré (tableau 42) .

TABLEAU 42

Substances étudiées	Acide mésoxalique décarboxylé %			
	15'	30'	45'	60'
Insoluble de levure	98,8	101,3	100,9	101,7
Glutathion	48,1	55,7	49,8	38,8
Cystéine	32,9	38,8	41,4	35,5

Seul, l'insoluble de levure conduit très rapidement à la décarboxylation totale de l'acide mésoxalique.

Des essais témoins, où l'acide glyoxylique ($C = M/1000$) est mis en présence des composés thiols retenus ($C = M/1000$) et de l'insoluble de levure (1%), montrent que cet acide disparaît par action de la cystéine et du glutathion. (tableau 43)

TABLEAU 43

Substances étudiées	Acide glyoxylique transformé %	
	30'	60'
Insoluble de levure	0	0
Glutathion	18	38
Cystéine	34	43

Cette constatation permet de comprendre pourquoi, sous l'influence de ces catalyseurs, la décarboxylation de l'acide mésoxalique est moins importante en 60' que celles observées après 30 ou 45 minutes.

3 - Conclusions :

A 38° et dans la zone de pH où nous avons étudié l'action de l'insoluble de levure sur l'acide mésoxalique, le glutathion décarboxyle également le kétodiacide ; son activité décroît lorsque la valeur du pH augmente. Comme pour l'insoluble de levure, il n'y a pas d'action secondaire du glutathion sur l'acide glyoxylique engendré par décarboxylation.

A la température de l'ébullition, l'insoluble de levure permet d'obtenir, en un temps très court, la transformation intégrale de l'acide mésoxalique. Il en est très différemment dans le cas du glutathion : la décarboxylation n'est pas quantitative et une partie de l'acide glyoxylique disparaît ; le glutathion se comporte, en ce sens, comme la cystéine.

B - UREASE , PAPAINASE , EDESTINE

1 - Généralités

L'uréase, globuline de haut poids moléculaire (PM 473.000), est le premier enzyme où fut signalée la présence de groupes thiols (153): groupes SH libres, protégés et masqués (75)⁽¹⁾. L'enzyme cristallisé (149), d'activité constante, renfermerait cinq molécules de cystéine par unité de protéine (21.300 g.) (75); les groupes SH libres ne seraient pas essentiels à son activité (74), ce rôle serait dévolu aux SH protégés.

La papainase du latex de *Carica Papaya* (7, 143) est une protéine de faible poids moléculaire (27.000 à 30.000) renfermant 1% de cystéine, 3,2% de cystine et 0,46% de méthionine (20). Ses groupes thiols sont uniquement du type protégé (7); c'est encore un enzyme qui requiert pour son activité la présence de groupes SH (16).

L'édestine, globuline des graines de *Cannabis sativa*, de poids moléculaire 310.000 (154, 152) renferme 0,36% de groupes disulfures, 0,51% de méthionine et 0,15% de groupes thiols (40) qui appartiennent uniquement au type masqué (69). L'édestine est considérée comme un protéide de réserve.

2 - Préparations d'uréase, de papainase et d'édestine.

a - Uréase de *Soja hispida* (27)

A 40g. de farine de *Soja*, on ajoute 200 ml. de solution tampon phosphate-acide citrique de MacILVAINE, de pH 7,2. On agite et on abandonne le mélange 12 heures à la glacière; on centrifuge le mélange glacé et on précipite le liquide filtré par 5 volumes d'alcool à 96° glacé; on agite, on centrifuge très rapidement et on lave le précipité par 3 fois avec de l'éther glacé. On sèche le précipité dans le vide sur chlorure de calcium et on le réduit en poudre fine par broyage au mortier (Rdt. 5g., soit 12,5%). La poudre ainsi obtenue, riche en uréase, est partiellement soluble dans l'eau. On la reprend par 100 ml. de tampon de pH 7,2; comme la poudre se mouille difficilement, on ajoute, au début, le tampon par petites fractions de 1 à 2 ml., on triture le mélange après chaque addition avec un gros agitateur, de manière à obtenir une pâte homogène que l'on dilue ensuite par des quantités plus importantes de solution tampon. On agite, on laisse en contact 5 heures à la glacière, on centrifuge, on décante en filtrant sur coton, on précipite le filtrat par l'alcool et on lave le précipité par l'éther, comme précédemment. La poudre obtenue, après dessiccation et broyage, est entièrement soluble dans l'eau; elle est riche en uréase mais renferme aussi d'importantes quantités d'allantoïnase.

(1) - Ces dénominations correspondent à celles de freely-SH-groups, sluggish-SH-groups et masked-SH-groups des auteurs américains (8)

b - Papaïnase -

Pour nos essais, nous avons retenu la préparation du Codex de titre 100, que nous avons purifiée au préalable. On reprend 10 g. de papaïne par 300 ml. d'eau distillée, on agite, puis abandonne le mélange 30 minutes au thermostat à 38°. On filtre pour séparer la partie insoluble puis on ajoute au filtrat, de l'alcool à 96° glacé en quantité suffisante pour avoir une liqueur alcoolique à 80 % environ. La papaïnase précipite, on la recueille sur filtre N° 4, on la sèche dans le vide sur chlorure de calcium. La préparation se présente sous l'aspect d'une poudre blanche entièrement soluble dans l'eau (Rdt: 40 %)

c - Edestine -

Nos expériences sur l'édestine ont été effectuées avec la préparation provenant de la maison Hoffmann-La Roche ,

3 - *Mise en évidence des propriétés décarboxylantes des thiols -protéines -*

a - Uréase

On porte au thermostat à 38° des milieux répondant aux compositions suivantes :

	E	T
Sol. de mésoxalate de Na ^{M/25} dans le tampon phosphate-ac.citrique de pH 2,2	3 ml.	3 ml.
Préparation d'uréase à 2% dans l'eau	3 ml.	-
« « « « « , portée 30' à 100°	-	3 ml.
Toluène	0,1 ml.	0,1 ml.

Après des temps variables, on dose l'acide glyoxylique apparu. Les résultats, exprimés en mg. d'acide mésoxalique décarboxylé par litre, figurent dans le tableau 44.

TABLEAU 44

Préparations d'uréase	Ac. mésoxalique décarboxylé en mg. par litre		
	2 h.	5 h.	8 h.
Prép. d'uréase	19,2	46,8	72,1
« « portée 30' à 100°	2,7	6,4	8,9

La préparation d'uréase décarboxyle l'acide mésoxalique. Il est intéressant de constater que la préparation enzymatique, qui a subi, au préalable, l'action de la chaleur, perd pratiquement ses propriétés décarboxylantes. SUMNER (150) a signalé que la réaction au nitroprussiate de l'uréase coagulée par la chaleur est infiniment plus faible que celle de l'uréase native, ce qui indique la disparition de groupes thiols par dénaturation. On peut aussi penser que la perte de l'activité décarboxylante a la même origine : une disparition des groupes sulfhydryles de la protéine. L'uréase, en tant que thiol-protéine, serait donc le type d'un « catalyseur de décarboxylation

thermolabile ».

Par ailleurs, l'étude des propriétés décarboxylantes, en fonction du pH, qui conduit aux résultats consignés dans le tableau 45, montre que l'uréase se comporte comme le catalyseur de la levure.

TABLEAU 45

(Mésoxalate de Na M/ 50 , Préparation d'uréase: 1%, T: 38°, Durée: 8 heures)

pH des essais	Ac. mésoxalique décarboxylé en mg. par litre
2,9	69,9
3,5	54,2
4,3	23,4
5,2	6,4
6,0	0

b - Papaïnase

Le protocole expérimental est identique à celui donné pour l'uréase. Les résultats sont consignés dans le tableau 46.

TABLEAU 46

Préparations de papaïnase	Ac. mésoxalique décarboxylé en mg. par litre		
	2 h.	4 h.	6 h.
Papaïnase	10,1	16,5	22,5
« portée 30' à 100°	10,1	17,9	23,9

Les propriétés décarboxylantes de la papaïnase sont faibles ; par contre, elles ne sont pas modifiées après action de la chaleur et l'enzyme en solution, portée 30 minutes à la température du bain-marie bouillant, garde toute son activité. En opposition avec l'uréase, la papaïnase se caractérise, en tant que catalyseur de décarboxylation, par sa thermostabilité.

c - Edestine

On porte au thermostat à 38° des milieux répondant aux compositions suivantes:

	E	T
Sol. de mésoxalate de Na (M/ 25) dans le tampon phosphate-ac. citrique de pH 2,2	3 ml.	3 ml.
Edestine	60 mg.	60 mg.
Edestine portée 30' à 100°	3 ml.	3 ml.
L'eau distillée	0,1 ml.	0,1 ml.
Toluène		

Après des temps variables, on dose l'acide glyoxylique apparü. Les résultats, exprimés en mg. d'acide mésoxalique décarboxylé par litre, figurent dans le tableau 47.

TABLEAU 47

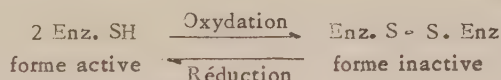
Préparations d'édestine	Ac. mésoxalique décarboxylé en mg p.l.		
	2h.	5h.	8h.
Edestine	27,1	74,9	120,4
Edestine, portée 30 ¹ à 100°	19,3	63,4	114,9

L'édestine décarboxyle l'acide mésoxalique et le traitement par la chaleur affecte peu ses propriétés décarboxylantes, comme le montre l'expérience T. Préalablement dénaturée par l'urée 10 M pendant 5 heures, elle conduit à des résultats du même ordre que ceux obtenus après dénaturation par la chaleur.

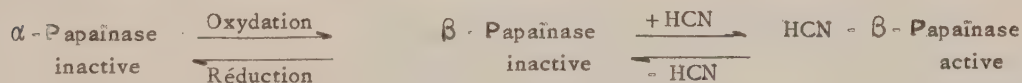
4 - Action de composés susceptibles d'avoir un rôle d'activateur.

L'hydrogène sulfuré, la cystéine et le glutathion (167, 113, 17)⁽¹⁾ sont des activateurs des réactions de protéolyse catalysées par la papainase ; par contre, ils ne modifient en rien les propriétés de l'uréase (151, 139, 48, 127). L'augmentation de l'activité uréasique, que l'on peut constater par addition de certains composés, doit être attribuée, d'après SUMNER, à une réaction de désinhibition et il n'existerait, en fait, que des anti-inhibiteurs⁽²⁾.

A côté des composés thiols, l'acide cyanhydrique possède également la propriété d'activer fortement la papainase. Selon BERSIN et LOGEMANN (17, 21), le nitrile formique aurait un rôle réducteur et la papainase constituerait un système d'oxydo-réduction, dont seule la forme réduite serait la forme active :



Ce point de vue n'a pas été confirmé par BERGMANN (15, 61, 84) ; selon cet auteur, la papainase existerait sous deux formes inactives dont une seule pourrait être activée par l'acide cyanhydrique.



(1) Le glutathion est considéré par BASU et NATH (10) comme l'activateur naturel de l'enzyme du latex de *Carica Papaya*.

(2) On a mis en évidence, chez *Canavalia ensiformis*, une substance dialysable (132) donnant une réaction positive au nitroprussiate et à laquelle on attribue un rôle de protection vis-à-vis de l'enzyme ; il s'agirait probablement du glutathion.

Il suffit de traces de cystéine (0,00004 M) ou de glutathion pour transformer l' α -papainase en β -papainase, seule forme qui puisse être activée par l'acide cyanhydrique (0,02 M) et donner un vrai système enzymatique⁽¹⁾. En effet, si on élimine l'acide cyanhydrique du milieu, on note que la β -papainase repasse sous sa forme inactive. Aussi, à l'appui de ces constatations, considère-t-on souvent l'acide cyanhydrique comme un coenzyme.

Par ailleurs, et d'un point de vue plus général, on sait que les groupes disulfures des protéines peuvent être réduits (8, 66) par la cystéine, le glutathion et l'acide cyanhydrique. Les dithiols qui se forment par action de la cystéine et du glutathion sont accompagnés de la conversion simultanée de ces agents réducteurs en leur forme oxydée (cystine, glutathion-S-S-glutathion). Avec l'acide cyanhydrique, il y a seulement mise en liberté d'un seul groupe thiol suivant la réaction :



Enfin, dans certains cas particuliers et en milieu très alcalin, on observe, par action de l'ion CN^- , une perte en soufre de la molécule protéique par suite de la formation d'une lanthionine (141, 46) :



Ces considérations et l'importance des groupes thiols dans le processus de décarboxylation nous ont conduite à étudier le comportement, en présence des dérivés précités, de la papainase, de l'uréase et de l'édestine considérées comme catalyseurs de décarboxylation.

a - Essais d'activation par la cystéine et le glutathion -

Les conditions expérimentales retenues sont les suivantes : Mésoxalate de sodium M/50 dans le tampon phosphate-acide citrique de pH 2,2 ; thiolprotéine : 1% ; dérivés thiols : M/200 ; température 38° ; durée d'action : 1 heure. Compte tenu de l'activité décarboxylante propre aux dérivés thiols, nous avons été amenée aux constatations suivantes :

- la cystéine n'a aucun effet d'activation vis-à-vis de l'uréase et de la papainase ; seule, l'édestine montre, en sa présence, un pouvoir décarboxylant légèrement accru (activation de l'ordre de 15%).
- le glutathion ne modifie pas les propriétés décarboxylantes de l'uréase et n'accuse que très peu celles de la papainase (activation de l'ordre de 10%). Par contre, il active notablement l'édestine (activation de l'ordre de 40%).

b - Essais d'activation par l'acide cyanhydrique -

Les essais d'activation par l'acide cyanhydrique ont porté sur la papainase, l'uréase, l'édestine et, à titre comparatif, sur l'insoluble de levure, la levure sèche intacte et le glutathion.

(1) , L'acide cyanhydrique peut être remplacé par la cystéine, le glutathion et l'hydrogène sulfuré non plus à l'état de traces mais à des concentrations élevées (0,02 M) ; chaque complexe enzymatique qui en résulte possède des propriétés différentes (85),

α - Activation:

La concentration en acide cyanhydrique, retenue pour les essais, correspond sensiblement à celle indiquée par WILLSTATTER et GRASSMANN (174) pour la mesure de l'activité protéolytique de la papainase.

Papaïnase : Dans une fiole jaugée de 20 ml., on introduit 400 mg. de papaine (2%) et 52 mg. de cyanure de potassium (M/25); on ajoute 15 ml. de tampon phosphate-acide citrique de pH 2,2 et la quantité d'acide chlorhydrique N (0,8 ml.) nécessaire à la neutralisation du cyanure, quantité déterminée au préalable en présence de l'indicateur de TASHIRO. On amène au trait de jauge avec le tampon, on bouche hermétiquement la fiole et on la maintient pendant 2 heures au thermostat à 38°. Au sortir du bain, on refroidit dans l'eau glacée, on verse 10 ml. de la solution dans une burette au 1/20ème (préparation des essais E₂) puis, dans les 10 ml. restant, on fait barboter un courant d'air pendant 15 minutes pour chasser l'acide cyanhydrique (préparation des essais E₃).

Uréase : La technique diffère légèrement car, dans les conditions opératoires, l'enzyme précipite. Dans une fiole jaugée de 20 ml., on commence par dissoudre 400 mg. de préparation d'uréase dans 0,2 ml. d'eau, on ajoute ensuite 52 mg. de cyanure, 0,8 ml. d'acide chlorhydrique N et 10 ml. de tampon de pH 2,2. On porte au thermostat à 38° pendant 2 heures et on opère ensuite comme la papainase.

Remarque : Les prélèvements de la solution d'uréase ne peuvent être faits qu'à la pipette. L'acide cyanhydrique doit être chassé en présence d'un antimoissant.

Edestine : Dans un tube à essai de 18 ml., on introduit 300 mg. d'édestine (2%), 10 ml. de tampon de pH 2,2 et, à l'aide d'un agitateur, on fait passer la protéine en solution. On ajoute ensuite 39 mg. de cyanure de potassium (M/25), 4,4 ml. de tampon de pH 2,2 en rinçant l'agitateur et 0,6 ml. d'acide chlorhydrique N. On bouche le tube, on agite et on abandonne 2 heures au bain-marie à 38°. On opère ensuite comme pour la papainase.

Remarque : Quand on ajoute le cyanure de potassium, il se produit un coagulum qui disparaît par agitation et par séjour au thermostat. Il est nécessaire de chasser l'acide cyanhydrique en présence d'un antimoissant.

Insoluble de levure et levure sèche intacte : On opère comme pour la papainase, mais les prélèvements doivent être effectués à la pipette.

β - Détermination de l'activité décarboxylante

On porte au thermostat à 38°, dans des tubes à hémolyse de 5 ml., des milieux répondant aux compositions suivantes :

	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	T
Sol. aqueuse de mésoxalate de Na M/ 25 *	2 ml.	2 ml.	2 ml.	-	2 ml.
Sol. aqueuse de mésoxalate de Na M/ 25 renfermant M/ 100 de glutathion	-	-	-	2 ml.	-
Catalyseur à 2% dans tampon pH 2,2	2 ml.	-	-	-	-
« « « « ,act.p.HCN	-	2 ml.	-	-	-
Catalyseur à 2% dans tampon pH 2,2, act.p.HCN , puis privée de HCN	-	-	2 ml.	-	-
Ac. cyanhydrique M/ 25 dans tampon pH 2,2	-	-	-	2 ml.	2 ml.

* Après addition du mésoxalate, le pH des essais est compris entre 2,9 et 3,0 . Pour l'uréase, le mésoxalate est dissous dans le tampon de pH 2,2 dilué au demi, l'activation ayant été faite avec ce tampon dilué .

Après des temps variables, on dose l'acide glyoxylique engendré . Pour cela, on transvase quantitativement le contenu de chaque tube dans une fiole jaugée de 100 ml. renfermant la quantité de soude N/ 10 nécessaire pour être en milieu neutre à l'indicateur de TASHIRO (condition requise pour le dosage de l'acide glyoxylique) , on complète au trait de jauge avec de l'eau distillée et on filtre, si nécessaire . Les résultats obtenus, en fonction du temps et pour chacun des agents catalytiques, figurent dans les tableaux 48, 49, 50, 51, et 52 .

TABEAU 48

Catalyseurs	Ac. glyoxylique formé en mg. p. litre	
	1 h.	2 h.
Acide cyanhydrique	17	25
Papaine	2,3	5,0
Papaine activée	37	47
« « « ,privée de HCN	9,2	13,2
Activation %	92	56

TABEAU 49

Catalyseurs	Ac. glyoxylique formé en mg. p. litre	
	0,30 h.	1 h.
Acide cyanhydrique	11	17
Uréase	2,8	5,5
« activée	41	50,6
« « « ,privée de HCN	-	8,7
Activation %	190	125

TABLEAU 50

Catalyseurs	Acide glyoxylique formé en mg. par litre			
	0,30 h.	1 h.	1,30 h.	2 h.
Acide cyanhydrique	11	17	21	25
Edestine	4	8	12	16
Edestine activée	33	51	63	70
« « , privée de HCN	-	10,5	-	15
Activation %	120	104	90	70

TABLEAU 51

Catalyseurs	Acide glyoxylique formé en mg. par litre			
	0,30 h.	1 h.	1,30 h.	2 h.
Acide cyanhydrique	11	17	21	25
Insoluble de levure	6,0	12,8	19,0	25
« « activé	25,7	40,2	50,7	57,4
Levure sèche intacte	6,0	11,5	17,5	23
« « « activée	25,7	40,1	52,3	56,6
Activation %	51-51	35-40	27-26	15-15

TABLEAU 52

Catalyseurs	Acide glyoxylique formé en mg. par litre			
	0,30 h.	1 h.	1,30 h.	2 h.
Acide cyanhydrique M/ 50	11	17	21	25
Glutathion M/ 200	7	14	21	28
« « + HCN M/ 50	17	25	35,2	41

L'essai témoin T permet de constater que l'acide cyanhydrique possède un pouvoir décarboxylant non négligeable vis-à-vis de l'acide mésoxalique. Néanmoins, le processus de décarboxylation catalysé par la papaïnase, l'uréase, l'édestine, l'insoluble de levure et la levure sèche intacte, est activé par l'acide cyanhydrique (Essais E₁ et E₂). L'activation cesse pratiquement si on élimine le nitrile formique du milieu (Essais E₃); on retrouve ici un phénomène déjà signalé pour la papaïnase considérée en tant qu'enzyme protéolytique.

La décarboxylation de l'acide mésoxalique par le glutathion n'est pas activée par l'acide cyanhydrique (Essais E₄); on constate même, en fonction du temps, une diminution de la teneur en acide glyoxylique

existant dans le milieu . Comme le précisent les résultats du tableau 53 , ce phénomène a pour origine une transformation de l'acide glyoxylique engendré sous l'influence de l'acide cyanhydrique .

TABEAU 53

Ac. glyoxylique M/ 500 , Sol. d'ac. cyanhydrique de conc. variables ,
T: 38° , 2 heures, pH des essais 3,0

Acide cyanhydrique	Ac. glyoxylique transformé %
M/ 25	92
M/ 50	78
M/ 100	50

5.- Conclusions . -

L'urée, la papainase et la globuline des graines de chanvre possèdent en commun la propriété de décarboxyler l'acide mésoxalique . Ces mêmes thiols protéines dénaturées par la chaleur se comportent différemment : l'urée perd ses possibilités décarboxylantes , l'édénine devient un peu moins active , l'activité de la papainase n'est pas modifiée . Il existe donc différents degrés dans le caractère de thermostabilité des protéines douées de propriétés décarboxylantes ⁽¹⁾ .

L'acide cyanhydrique exalte le pouvoir décarboxylant des thiols protéines ; toutefois, on observe, avec le temps , une diminution du pourcentage d'activation . Cette diminution peut s'expliquer par la formation éventuelle de la cyanhydrine glyoxylique ; l'action de l'acide cyanhydrique sur l'acide glyoxylique en apporte une preuve .

Contrairement au phénomène constaté avec les protéines envisagées , l'acide cyanhydrique n'augmente pas les propriétés décarboxylantes du glutathion . L'inhibition que l'on constate, même en fonction du temps, n'est qu'apparente ; elle se justifie, comme précédemment , par la disparition de l'acide glyoxylique engendré .

L'activation ne semble pas due à la mise en liberté de nouveaux groupes thiols ; on remarque, en effet, au cours des essais avec l'acide cyanhydrique , qu'elle cesse pratiquement dès qu'on élimine cet acide du milieu . Par ailleurs , au pH d'activation , une rupture des ponts disulfures par les composés essayés paraît improbable , les propriétés réductrices de l'acide cyanhydrique et des dérivés thiols ne se manifestent qu'au-dessus de pH 7,0.

(1) La décarboxylation que l'on constate avec les protéines végétales, se retrouve également avec les protéines d'origine animale (albumines du blanc d'oeuf , foie de veau, foie de boeuf) . L'albumine d'oeuf conduit à des résultats intéressants en ce qui concerne la réactivité des groupes thiols vis-à-vis de l'acide mésoxalique : les propriétés décarboxylantes de l'albumine native sont insignifiantes comparées à celles qu'acquiescent les protéines du blanc d'oeuf dénaturées par la chaleur .

C - CONCLUSIONS

Les résultats concernant le glutathion et les thiols protéines montrent qu'il n'y a pas un catalyseur spécifique de la décarboxylation de l'acide mésoxalique, mais qu'il existe des systèmes décarboxylants pouvant comprendre, séparément ou à la fois, des thiols solubles et des thiols fixés. Il s'agit donc, à l'encontre de ce qui caractérise un enzyme, non pas d'un catalyseur défini possédant une spécificité de substrat plus ou moins étroite, mais d'un substrat déterminé susceptible d'être attaqué par des catalyseurs très différents ayant tous le même groupe actif, le groupe -SH.

S'il ne peut être question de considérer l'action décarboxylante de la levure comme un processus enzymatique, on pourrait penser, par contre, que la préparation d'uréase renferme une « Mésoxalcarboxylase ». En fait, le comportement très différent des thiols-protéines vis-à-vis de l'acide mésoxalique, trouve principalement son explication dans la nature du mécanisme de décarboxylation qui est infiniment simple. Puisque seule l'intervention des groupes thiols dans le processus est déterminante, et qu'une des conséquences de la dénaturation (126) est d'entraîner des modifications dans la composition sulphydrilée des protéines, on conçoit qu'une protéine possédant des propriétés décarboxylantes puisse réagir différemment avant et après dénaturation. L'uréase, enzyme dont la teneur en groupes thiols diminue considérablement par chauffage (150), perd aussi, après dénaturation, la propriété de décarboxyler l'acide mésoxalique. Par contre, l'ovalbumine, dont on sait que 50 % des SH masqués sont révélés par la chaleur (68, 117, 156), présente un pouvoir décarboxylant plus accusé après un séjour à la température du bain-marie bouillant. On peut donc prévoir que tous les intermédiaires, entre un catalyseur de décarboxylation thermolabile et un catalyseur dont les propriétés sont exaltées par dénaturation thermique, seront susceptibles d'exister.

Comme nos déterminations ont porté uniquement sur des préparations enzymatiques (Uréase, papaïne), on peut se demander si la décarboxylation de l'acide mésoxalique n'est pas également due à des thiols-protéines autres que les enzymes considérés mais coexistants avec ceux-ci dans les préparations. Si la décarboxylation de l'acide mésoxalique par la préparation d'uréase était principalement due à un catalyseur thermostable du type, par exemple, de celui de la levure, la plus grande partie de l'activité devrait subsister après dénaturation; il n'en est rien. Apparemment, on peut penser que la même protéine est responsable d'une réaction d'hydrolyse et d'une réaction de desmolyse; les groupes thiols nécessaires mais non suffisants au fonctionnement de l'uréase en tant qu'hydrolase, se montreraient capables, pour une valeur donnée du pH, de provoquer la décarboxylation de l'acide mésoxalique.

En ce qui concerne le comportement des thiols-protéines après dénaturation thermique, certains rapprochements peuvent être faits entre les observations de ROTHEN (138) sur la thermostabilité de la ribonucléase et l'action, sur l'acide mésoxalique, des thiols-protéines traitées par la chaleur. La stabilité relative de la ribonucléase à la chaleur (49, 87, 140) serait en relation avec le poids moléculaire relativement faible de sa macromolécule (12.700). En ce qui nous concerne, on remarque également que la papaïne de poids moléculaire 27.000 à 30.000 est un catalyseur de décarboxylation thermostable alors que l'uréase de poids moléculaire 473.000 perd ses propriétés décarboxylantes par dénaturation. Bien que présentant un poids moléculaire de

310.000, l'édénine paraît faire exception, car elle se comporte sensiblement comme la papainase ; en fait, il a été montré que la dénaturation de cette globuline provoque la scission de la molécule initiale en unités de poids moléculaire plus faible (4, 1).

On constate que l'acide cyanhydrique est un activateur de la décarboxylation de l'acide mésoxalique par les thiols-protéines et qu'il possède par lui-même un pouvoir décarboxylant non négligeable. Pour expliquer cette propriété nouvelle du nitrile formique, on peut admettre que sa fixation sur le groupe carbonyle du céto-acide crée un déséquilibre moléculaire qui se traduit par le départ d'une molécule d'anhydride carbonique et la formation d'acide glyoxylique.



Cette hypothèse, qui repose sur la formation transitoire d'une cyanhydrine mésoxalique, permet-elle de rendre compte de l'activation importante des thiols-protéines par l'acide cyanhydrique, comme les données d'un travail de TAUBER (155) sur la décarboxylation de l'acide pyruvique le laisserait supposer ⁽¹⁾ ? Les résultats obtenus avec le glutathion ne semblent pas confirmer cette manière de voir ; en effet, l'acide cyanhydrique n'exalte pas les propriétés décarboxylantes du tripeptide. Il paraît plus logique de penser que le mécanisme de l'activation est identique à celui proposé pour la papainase par BERGMANN (15, 61, 84) qui considère l'acide cyanhydrique comme un véritable coenzyme.

Enfin, il ressort de cette étude que les possibilités réactionnelles du groupe thiol varient selon que celui-ci appartient au glutathion ou qu'il fait partie intégrante d'une molécule protéique. A la température de l'ébullition, seules les protéines de levure permettent d'obtenir facilement la décarboxylation quantitative de l'acide mésoxalique et sont sans action sur l'acide glyoxylique engendré ; l'activation, que l'on observe avec l'acide cyanhydrique, intéresse exclusivement les catalyseurs de nature protéique. Ces différences de réactivité peuvent être attribuées, semble-t-il, à un alourdissement de la molécule du glutathion et le tripeptide mériterait, en l'occurrence, d'être considéré comme un procatalyseur.

(1) D'après MEYERHOF et KAPLAN (115) l'action du cyanure sur l'acide pyruvique conduirait à un parapyruvate sur lequel la carboxylase est sans action.

CHAPITRE VI

CONCLUSIONS

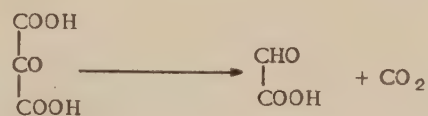
SE RAPPORTANT AUX

RECHERCHES D'ORDRE BIOCHIMIQUE

CONCLUSIONS

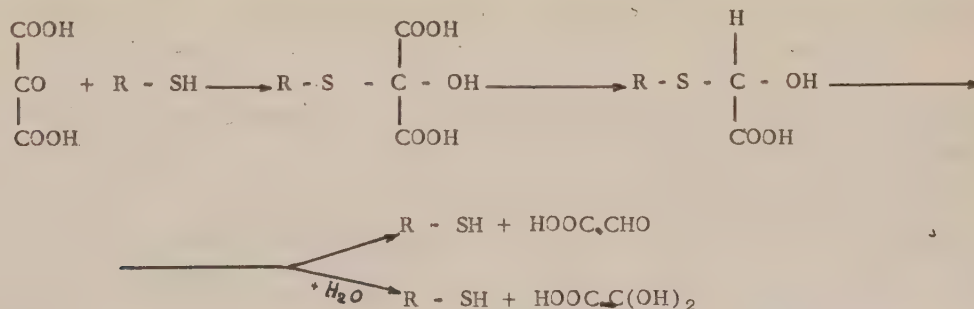
SE RAPPORTANT AUX RECHERCHES D'ORDRE BIOCHIMIQUE

La levure sèche, contrairement aux affirmations de WETZEL, est capable de décarboxyler l'acide mésoxalique. Les déterminations, reposant simultanément sur la mesure du volume d'anhydride carbonique dégagé et sur le dosage de l'acide glyoxylique engendré, rendent compte de la formation, au cours du processus, de quantités stoechiométriques d'anhydride carbonique et d'acide glyoxylique,



Le cétoacide subit donc une α -décarboxylation du type de celles que catalyse spécifiquement la carboxylase de NEUBERG. Cependant, il ne saurait être question de rendre cet enzyme responsable du phénomène, puisque la levure portée à l'ébullition conserve ses propriétés décarboxylantes. Il s'agit d'un nouveau type de catalyseur qui se distingue par son pH optimum (pH 3,0 à 3,8) et par sa thermostabilité remarquable; les groupes thiols sont essentiels à la réalisation du processus qui, par ailleurs, est intimement lié à la présence du groupe carbonyle libre de l'acide.

Le comportement, vis-à-vis de l'acide mésoxalique, de dérivés sulphydrylés de bas poids moléculaire (Cystéine, glutathion, acides thioglycolique et thiomalique, dimercaptopropanol), montre que les groupes thiols sont directement responsables du phénomène et permet de concevoir le mécanisme d'action du catalyseur. La formation entre le substrat et le catalyseur d'une semimercaptoïne instable, suivie de la perte d'une molécule d'anhydride carbonique par ce composé, conduirait au semimercaptal glyoxylique qui, par simple réarrangement moléculaire ou sous l'influence de l'eau, régénérerait le catalyseur avec mise en liberté de l'acide glyoxylique:



L'acide thiomalique fournit l'exemple d'un modèle nouveau de carboxylase entièrement différent des modèles étudiés par LANGENBECK où le rôle catalytique est dévolu au groupe amino. Avec l'acide thiomalique, le pH optimum de décarboxylation se situe à 2,2 et, dans la zone de pH où la décarboxylation se manifeste, il apparaît des quantités équimoléculaires d'anhydride carbonique et d'acide glyoxylique. Enfin, dans les

conditions où la concentration en substrat est telle que la vitesse limite de transformation est atteinte, la décarboxylation est directement proportionnelle au temps d'action.

La possibilité de décarboxyler l'acide mésoxalique ne se limite pas aux protéines de la levure; les préparations d'uréase, de papaïnase, d'édestine et l'ovalbumine possèdent aussi cette propriété. Après dénaturation par la chaleur, la papaïnase se comporte comme un catalyseur thermostable, les propriétés de l'édestine ne sont pratiquement pas modifiées, la préparation d'uréase perd son activité et le pouvoir décarboxylant de l'ovalbumine est accru.

La pluralité des catalyseurs de décarboxylation et leur comportement différent après dénaturation thermique, doivent-ils entraîner l'exclusion du processus de décarboxylation de l'acide mésoxalique du groupe des réactions catalysées par les cétoacides-carboxylases ?

La pluralité des catalyseurs trouve sa justification dans la simplicité même de la catalyse : le groupe thiol étant directement responsable du phénomène, il n'y a pas, a priori, d'impossibilité à ce que les protéines diverses puissent catalyser la même réaction, sous réserve que ces protéines possèdent le groupe essentiel à la réalisation du processus. Le comportement différent des préparations étudiées, après dénaturation thermique, se conçoit par des modifications possibles de la composition sulphydrylée des protéines : apparition de nouveaux groupes thiols ou, au contraire, disparition de ceux existants dans la molécule native.

Si l'absence de spécificité et de thermostabilité ne permet pas de considérer comme enzyme, suivant la définition classique que l'on en donne, toute protéine responsable de la décarboxylation de l'acide mésoxalique, il faut cependant insister sur le fait que la transformation réalisée par un catalyseur de nature protéique, n'est pas similaire à celle provoquée par le glutathion. Ainsi, aucune activation par l'acide cyanhydrique n'a lieu avec le tripeptide, alors que le comportement des thiols-protéines rappelle celui de la papaïnase agissant en tant qu'hydrolase. Il semble, dans ce cas, que l'on puisse assimiler la papaïnase, l'uréase et l'édestine, jouant le rôle de catalyseur de décarboxylation, à des apoenzymes et l'acide cyanhydrique à un coenzyme, car le nitrile formique conduit à la formation d'un complexe particulièrement actif et éminemment dissociable. Les « catalyseurs protéiques » responsables de la décarboxylation de l'acide mésoxalique, présenteraient donc, sous certains rapports, des modalités d'action comparables à celles d'un enzyme.

En résumé, nous proposons de regarder la décarboxylation de l'acide mésoxalique comme un type de catalyse biologique où la nature du groupe catalytique a pu être précisée, et son action définie. Malgré les particularités que présente la décarboxylation du cétoacide, particularités qui trouvent leur origine dans la simplicité du groupe actif, il nous semble logique de compter ce nouveau processus au nombre des réactions catalysées par les cétoacides-carboxylases.

La mise en évidence de l'action décarboxylante du glutathion, de la cystéine, des acides thioglycolique et thiomalique et du dimercaptopropanol, fait ressortir une nouvelle propriété de la fonction thiol : celle de catalyseur de décarboxylation. L'acide mésoxalique vient donc s'ajouter à la liste des réactifs déjà connus des groupes sulphydrylés. Il présente, sur les réactifs habituels, et sur ceux d'oxydation en particulier, la pro-

priété de ne mettre en jeu qu'un seul groupe thiol ; il se comporte, en ce sens, comme l'acide p-chloromercuribenzoïque . A concentration moléculaire égale, et pour un même pH , la réactivité des dérivés thiols s'avère différente ; elle laisse entrevoir l'importance de la configuration moléculaire des catalyseurs et l'interaction possible, dans le processus, des radicaux avoisinant le groupe thiol .



PARTIE PHYSIOLOGIQUE

CHAPITRE I

	Pages
<i>DEFINITION D'UNE UNITE D'ACTIVITE ET D'UNE VALEUR MESOXALIQUE</i>	85
<i>DETERMINATION DE L'ACTIVITE MESOXALIQUE</i>	85

DEFINITION D'UNE UNITE D'ACTIVITE ET D'UNE VALEUR MESOXALIQUE

DETERMINATION DE L'ACTIVITE MESOXALIQUE

On ne peut envisager d'utiliser le processus de décarboxylation de l'acide mésoxalique à des fins quantitatives quand plusieurs thiols existent en mélange, ce qui est généralement le cas dans les milieux biologiques; en effet, nous avons montré que la réactivité des composés thiols vis-à-vis de l'acide mésoxalique peut être différente. Cependant, comme il s'agit d'un processus catalytique, il est possible, par la mesure des vitesses de décarboxylation, de comparer l'activité globale de différents systèmes. Aussi, dans le but d'étudier le comportement des végétaux envers l'acide mésoxalique, avons-nous défini une unité d'activité, basée sur le dosage de l'acide glyoxylique engendré, et une valeur mésoxalique.

L'unité d'activité mésoxalique ($U.Mx$) correspond à la décarboxylation en 2 heures, dans le tampon phosphate-acide citrique de Mac-ILVAINE de pH 2,2 et à 38°, de 1,36 mg (0,00001 M) d'acide mésoxalique, la concentration en substrat étant de 0,02 M.

La valeur mésoxalique ($V.Mx$), est exprimée par le nombre d'unités mésoxaliques contenues dans 10 g de végétal sec.

DETERMINATION DE L'ACTIVITE MESOXALIQUE

L'activité mésoxalique est le reflet des propriétés décarboxylantes attribuables aux thiols solubles et aux thiols fixés, car les déterminations sont faites sur un matériel végétal dont les constituants solubles n'ont pas été préalablement extraits. Pour désigner l'ensemble des composés thiols, susceptibles d'intervenir dans le processus, nous retiendrons l'expression «catalyseur de décarboxylation».

Les différences dans les valeurs mésoxaliques observées, ou les variations de la valeur mésoxalique au cours de l'évolution d'un végétal, peuvent être dues, soit à des modifications de la teneur en composés thiols, soit à un changement dans la réactivité des groupes thiols. La simple connaissance de la valeur mésoxalique ne permet pas d'en faire la discrimination.

1 - Préparation du matériel à étudier -

Le matériel végétal, coupé en fragments de 0,5 cm environ, est immédiatement mis à sécher dans le vide sur chlorure de calcium. On utilise, à cet effet, une cloche de grande capacité (40 litres environ) garnie de cuvettes remplies de chlorure de calcium et on fait le vide à l'aide d'une pompe à huile; il suffit, en général, de 12 à 36 heures pour obtenir une dessiccation complète. On broie ensuite au moulin puis au mortier jusqu'à obtention d'un échantillon homogène après tamisage (tamis n° 80); dans certains cas (tiges fibreuses, racines, feuilles de graminées, mousses, ...), il est indispensable de dilacérer aux ciseaux. On réserve une partie aliquote pour le dosage à 100° de l'humidité résiduelle et, sur la fraction restante, on détermine l'activité

en suivant le protocole expérimental ci-après.

2 - Protocole expérimental .

	E	T
Solution M/ 25 de mésoxalate de Na ($\text{NaOOC}_2\text{CO}_2\text{COONa}$, H_2O) dans tampon phosphate-ac.citrique de pH 2,2	5 ml,	-
Tampon phosphate-ac.citrique de pH 2,9	-	5 ml,
Eau distillée	5 ml,	5 ml,
Matériel végétal	100 mg,	100 mg.
Toluène	0,05 ml,	0,05 ml.
Température	38°	38°
Durée de l'essai	2 heures	2 heures

Remarques - L'addition du mésoxalate au tampon de pH 2,2 conduit à l'obtention d'une solution de pH 2,9 . Les déterminations peuvent être effectuées sur des quantités moindres , il suffit de respecter les proportions .

3 - Mode opératoire .

Dans une fiole conique de 30 ml, on introduit le matériel végétal (100 mg, exactement pesé), 5 ml. d'eau distillée et on laisse 15 minutes en contact . On ajoute ensuite 5 ml. de solution M/ 25 de mésoxalate dans le tampon de pH 2,2 , puis le toluène ; on bouche la fiole et on porte au thermostat à 38° (Essai E) . On effectue parallèlement un essai témoin T où la solution de mésoxalate est remplacée par 5 ml. de solution tampon de pH 2,9 . Après 2 heures de séjour au thermostat, on retire les fioles, on refroidit dans l'eau glacée et on transvase quantitativement dans des fioles jaugées de 125 ml, contenant la quantité de soude N ou N/10 nécessaire à la neutralisation des 5 ml, des solutions tampons utilisées (quantité déterminée au préalable, en présence de l'indicateur de TASHIRO) . On ajuste au trait de jauge, on agite et on filtre sur filtres sans cendres à filtration lente .

On introduit avec précaution dans des tubes à essais en pyrex de 18cm/ 18mm, , parfaitement propres et secs, 2ml, mesurées à la pipette de précision, de chacun des milieux filtrés E et T . On ajoute 0,1 ml. (2 gouttes) de solution de chlorhydrate de phénylhydrazine à 4 % dans l'eau distillée et on porte le tube 2 minutes au bain-marie bouillant . On refroidit ensuite dans le mélange glace-eau ($T < 5^\circ$) pendant 1 minute; on ajoute à la microburette au 1/20ème, 1,2 ml. d'acide chlorhydrique pur ($d = 1,19$, exempt de fer), on agite jusqu'à ce que le contenu du tube soit homogène, puis on introduit 0,1 ml. (2 gouttes) de solution de ferricyanure de potassium à 10% dans l'eau distillée . On agite à nouveau et on exécute les mesures à l'électrophotomètre . On obtient pour l'expérience E une valeur de l'absorption égale à N . La détermination effectuée sur le milieu T permet de connaître la valeur de l'absorption N' donnée par des composés autres que l'acide glyoxylique provenant de l'acide mésoxalique (acides allantoïque, dihydroxymaléique, ...), composés susceptibles de réagir, après scission, avec le réactif hydrazinique .

On effectue alors les essais à blanc de la façon suivante : on porte 2 minutes au bain-marie bouillant 2 ml. de chacun des milieux E et T renfermant 0,1 ml. de la solution de chlorhydrate de phénylhydrazine, on refroidit dans le mélange eau-glace, on ajoute 1,2 ml. d'acide chlorhydrique concentré, 0,1 ml. d'eau distillée

en remplacement de la solution de ferricyanure et on effectue les mesures à l'électrophotomètre. On obtient ainsi les valeurs des absorptions propres aux solutions, auxquelles on ajoute celle donnée par 0,1 ml. de solution de ferricyanure de potassium à 10 % dans 2,1 ml. d'eau + 1,2 ml. d'acide chlorhydrique concentré. Soit n et n' les valeurs de ces essais à blanc.

Remarques - La dilution retenue permet d'obtenir des réactions colorées d'intensité suffisante pour que les lectures à l'électrophotomètre soient correctes. Après dilution, la concentration en mésoxalate de la solution devient sensiblement égale à $M/625$. Or, pour cette concentration, nous avons constaté que le sel de sodium de l'acide mésoxalique subit, en solution aqueuse, une légère décarboxylation qui correspond à la mise en liberté de 0,16 mg. d'acide glyoxylique par litre de solution dosée (voir page 12). Nous avons déterminé, à nouveau, l'importance de cette décarboxylation en nous plaçant dans les conditions fixées pour la mesure de l'activité mésoxalique, c'est-à-dire en milieu tamponné et après neutralisation par la soude: la décarboxylation spontanée ne libère plus que 0,08 mg. d'acide glyoxylique par litre. Bien que très faible, cette décarboxylation apporte une erreur systématique qui devient importante lorsque les valeurs mésoxaliques déterminées sont peu élevées. Il convient donc d'en tenir compte et pour cela, nous retranchons de la valeur trouvée, le terme correctif 1,35 qui, dans nos conditions expérimentales, représente, calculé en valeur mésoxalique, la décarboxylation spontanée du mésoxalate (voir calculs).

- Il n'est pas nécessaire de procéder à une défécation avant de faire les dosages, car, par simple filtration, on obtient des solutions limpides ou présentant une très légère opalescence (cas de certaines graines) qui ne gêne pas les mesures.

- Les solutions de chlorhydrate de phénylhydrazine et de ferricyanure de potassium seront toujours préparées au moment de l'emploi.

4 - Calculs -

Compte tenu des essais à blanc, les valeurs des absorptions, exprimées en divisions du tambour de l'électrophotomètre, sont égales à :

$$N - n \text{ pour l'expérience E et } N' - n' \text{ pour l'expérience témoin T}$$

En se reportant à la courbe tracée avec les résultats consignés dans le tableau 3 de la page 14, on détermine les quantités d'acide glyoxylique qui correspondent à ces absorptions, soient X et X' . La différence $X - X'$ donne le nombre de mg. d'acide glyoxylique engendré par litre de solution dosée.

Si d est la dilution, H l'humidité résiduelle pour cent, la quantité d'acide mésoxalique décarboxylé par 10 g. de matériel végétal sec est donnée par la relation

$$(X - X') \times d \times \frac{\text{ac.mésoxalique}}{\text{ac.glyoxylique}} \times \frac{100}{100 - H} \text{ ou } (X - X') \times d \times \frac{136,06}{74,04} \times \frac{100}{100 - H} = P$$

d'où la valeur mésoxalique du matériel considéré est égale à $\frac{P}{1,36}$. Elle devient, compte tenu de l'erreur systématique apportée par la décarboxylation spontanée du mésoxalate :

$$\frac{P}{1,36} = \left\{ \frac{0,08 \times d \times \frac{\text{ac. mésoxalique}}{\text{ac. glyoxylique}}}{1,36} \right\} = \frac{P}{1,36} = 1,35$$

Exemple : Détermination de la valeur mésoxalique des feuilles d'*Arum maculatum*. Prise d'essai 100mg. Humidité résiduelle : 4,2% , Dilution 12,5 . Lectures à l'électrophotomètre :

Expérience E : $N - n = 157 - 36 = 121$; Expérience T : $N' - n' = 47 - 36 = 11$

Ac. glyoxylique en mg. par litre de solution dosée : $X = 1,99$; $X' = 0,18$ d'où :

$$X - X' = 1,99 - 0,18 = 1,81 \text{ mg.}$$

Ac. mésoxalique décarboxylé en mg. par 10g. de végétal sec :

$$1,81 \times 12,5 \times \frac{136,06}{74,04} \times \frac{100}{100 - 4,2} = 43,4 \text{ mg.}$$

$$\text{Valeur mésoxalique des feuilles : } \frac{43,4}{1,36} - 1,35 \neq 30,5$$

÷
÷ ÷
÷

CHAPITRE II

APERCU DES PROPRIETES DECARBOXYLANTES DES

VEGETAUX VIS-A-VIS DE L'ACIDE MESOXALIQUE

TABLEAU D'ENSEMBLE

APERCU DES PROPRIETES DECARBOXYLANTES DES VEGETAUX VIS-A-VIS DE L'ACIDE MESOXALIQUE

Le tableau 54 donne une vue d'ensemble des propriétés décarboxylantes des végétaux vis-à-vis de l'acide mésoxalique

TABLEAU 54

CHAMPIGNONS				V. Mx
Saccharomycétacées . <i>S. cerevisiæ</i> , Lev. haute vivante				non mesurable
«	«	«	« , séchée à 42°	25,7 - 28,4
«	«	«	« , « dans le vide	31,8 - 35,8
«	«	«	« , ins. lev. tuée par ébullition	29,4 - 32,7
«	«	«	« , « autolysée	12,2
«	«	«	« , dénaturée urée II M (8)	26,0 - 28,4
«	«	«	« , « guanidine , HCl 5 M (8)	23,3 - 25,0
«	«	«	« , zymine selon BUCHNER (2)	18,2
«	«	«	basse vivante	non mesurable
«	«	«	« , séchée à 42°	27,4 - 31,8
«	«	«	« , ins. lev. tuée par ébullition	35,5
«	«	«	« , « autolysée	29,4
Agaricacées . <i>Agaricus campester</i> Fr. ex. L., Champ. jeune, Chap.				4,3
«	<i>Mucidula mucida</i> (Fr. ex Schr.) Pat. Champ. jeune, Chap.			8,2
«	« <i>radicata</i> (Fr. ex Rehl.) Bours. , Champ. jeune, Chap.			2,0
«	<i>Hypholoma sublateritium</i> (Fr.) Quél., Champ. jeune, Chap.			5,4
«	« <i>fasciculare</i> (Fr. ex Huds.) Quél., Champ. jeune, Chap.			3,9
«	<i>Panus stipticus</i> Fr. Chap. jeune			2,2
«	<i>Schizophyllum commune</i> Fr. , Champ. jeune			1,3
Bolétacées . <i>Boletus purpureus</i> Fr. , Champ. jeune , Chap.				5,9
«	« <i>elegans</i> Fr. ex Sch. , Champ. jeune , Chap. sans hyménium			1,0
«	« « « « , hyménium			4,0
«	« <i>scaber</i> Fr. ex Bull. , Champ. jeune, Chap. sans hyménium			0
«	« « « « , hyménium			9,2

BRYOPHYTES

Polytrichacées . <i>Polytrichum commune</i> L., partie apicale tige feuillée	2,3
Funariacées . <i>Funaria hygrometrica</i> Hedw. , partie feuillée seule	3,0
« « « « , capsule avec opercule	3,8
Dicranacées . <i>Leucobryum glaucum</i> Hpe. , partie apicale tige feuillée	2,0
Fontinalacées . <i>Fontinalis antipyretica</i> L. , tige feuillée	0
Hypnacées . <i>Hypnum triquetrum</i> L. , partie apicale tige feuillée	1,6
Leskeacées . <i>Thuidium tamariscinum</i> B.E. , partie apicale tige feuillée	1,3
Sphagnacées . <i>Sphagnum</i> sp. , partie apicale tige feuillée	0,8

PTERIDOPHYTES

Osmondacées . <i>Osmunda regalis</i> L. , folioles sans sores	négligeable
Polypodiacées . <i>Polypodium vulgare</i> L., feuilles sans sores	1,3
« « « « , « avec sores jaune-verdâtre	0
« <i>Polystichum Filix-mas</i> Roth., f. sans sores	2,0
« « « « , f. « blanc-jaunâtre	0
Salviniacées . <i>Salvinia natans</i> All.	0

PHANEROGAMES

(Monocotylédones)

Alismacées . <i>Alisma natans</i> L., feuilles flottantes (limbe)	22,6
« <i>Sagittaria sagittaeifolia</i> L., feuilles submergées rubanées	négligeable
Potamogetonacées . <i>Potamogeton crispus</i> L., feuilles	négligeable
« « « <i>natans</i> L., feuilles flottantes (limbe)	2,3
Hydrocharidacées . <i>Elodea canadensis</i> Rich., tige feuillée	3,6
Graminées . <i>Zea Mays</i> L., racines (début de la végétation)	3,2
« « « , feuilles (début de la végétation)	7,2
« « « , fruits	1,0
« <i>Avena sativa</i> L., feuilles (avoine précoce de Noisy)	18,9
« <i>Secale cereale</i> L., feuilles	23,8
« <i>Aegilops triuncialis</i> L., feuilles	15,3
« <i>Triticum dicoccum</i> Schubl., feuilles	17,9
« <i>Hordeum sativum</i> L., feuilles (orge inerme)	20,6
Aracées . <i>Acorus Calamus</i> L., racines	0
« « « , rhizome	0
« « « , feuilles	19,6
« « « , spathe	19,6

Aracées .	<i>Arum maculatum</i> , racines	6,4
«	« « , rhizome	3,0
«	« « , feuilles (limbe)	30,5
«	« « , spathe	10,9
«	« « , jeunes fruits	30,0
«	<i>Lemna minor</i> L. , plante entière	2,7
Liliacées .	<i>Ruscus aculeatus</i> L. , cladodes	6,5
«	<i>Danae racemosus</i> L. , cladodes	3,8
«	« « , tige	0
«	<i>Asparagus officinalis</i> L. , cladodes	22,8

PHANEROGAMES (Dicotylédones)

Casuarinacées .	<i>Casuarina equisetifolia</i> Forst. , ramules assimilatrices	10,2
Pipéracées .	<i>Piper nigrum</i> L. , limbes	0
Juglandacées .	<i>Juglans regia</i> L. , limbes	négligeable
«	« « , fleurs mâles	0,8
«	« « , fleurs femelles	0,8
«	« « , jeunes fruits	1,1
Betulacées .	<i>Betula verrucosa</i> L. , limbes	9,1
«	« « , fruits (chatons)	1,0
Moracées .	<i>Cannabis sativa</i> L. , feuilles	13,6
«	« « , graines	5,5
Polygonacées .	<i>Muehlenbeckia platyclada</i> Meissn. , cladodes	4,3
«	<i>Rumex acetosa</i> L. , limbes	5,9
«	<i>Fagopyrum tataricum</i> Gaertn. , limbes	17,3
Chenopodiacées .	<i>Beta vulgaris</i> Moq. , (1/2 sucrière de Puisieux) limbes 1er an.	15,5
«	« « « « « 2ème an.	15,5
Nymphéacées .	<i>Nuphar luteum</i> Sm. , limbes	10,9
Crucifères .	<i>Brassica juncea</i> Coss. , limbes	15,7
«	« <i>Napus</i> Koch. var. <i>Napobrassica</i> (Rutabaga champion à collet rouge) limbes	10,9
«	« « « « (chou navet blanc d'Aubigny), limbes	12,0
«	« <i>Rapa</i> Koch. (Navet rave du Limousin) , limbes	14,5
Papavéracées .	<i>Papaver somniferum</i> L. , limbes	12,8
Linacées .	<i>Linum usitatissimum</i> L. , feuilles	10,3
«	« « , graines	1,6

Euphorbiacées .	<i>Ricinus communis</i> L. , limbes	19,6
Callitrichacées .	<i>Callitriche vernalis</i> Kutzi , feuilles flottantes	8,1
«	« « « « submergées	0,8
Ceratophyllacées .	<i>Ceratophyllum demersum</i> L. , extrémités des rameaux	4,9
Acéracées .	<i>Acer Negundo</i> L. (var. feuilles panachées) f. vertes (limbes)	13,4
«	« « « « f. panachées (limbes)	15,7
«	« « « « f. blanches (limbes)	11,2
«	<i>Pseudo-Platanus</i> L. , limbes	6,2
«	« « « « jeunes fruits	négligeable
«	<i>campestre</i> L. , limbes	5,7
«	<i>platanoïdes</i> L. , limbes	6,5
Rhamnacées .	<i>Colletia spinosa</i> Lamk. cladodes	5,4
«	« « « « , feuilles	10,4
Légumineuses .	<i>Pisum sativum</i> L. , limbes	24,3
«	« « « « , graines	6,4
«	<i>Lupinus albus</i> L. , limbes	25,5
«	« « « « , graines	8,9
«	<i>Vicia Faba</i> L. , limbes	22,8
«	« « « « , graines non mûres	3,0
«	<i>Ervum Lens</i> L. , limbes	23,8
«	<i>Lotus corniculatus</i> L. , limbes	12,0
«	<i>Galega officinalis</i> L. , limbes	4,5
«	<i>Trigonella Faenum-graecum</i> L. , limbes	19,4
«	<i>Anthyllis vulneraria</i> L. , limbes	17,5
«	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. , limbes	15,8
«	<i>Spartium junceum</i> L. , limbes	14,5
«	<i>Trifolium pratense</i> L. (trèfle violet de Bretagne) limbes	2,0
Hydrocaryacées .	<i>Trapa natans</i> L. , feuilles flottantes (limbes)	11,1
«	« « « « , jeunes fruits	3,9
Ombellifères .	<i>Petroselinum sativum</i> Hoffm. racines (cylindre central)	2,8
«	« « « « (écorce)	1,1
«	« « « « , jeunes feuilles (limbes)	17,9
«	« « « « , feuilles adultes (limbes)	20,6
Solanacées .	<i>Solanum tuberosum</i> L. var. Bintje, limbes	15,8
«	« « « « Ostbote, limbes	17,0

Abréviations : Champ. = Champignon , Chap. = Chapeau , f = feuille , dénât. = dénaturation , ins. lev. = insoluble de levure , p. ébull. = par ébullition , an. = année .

CHAMPIGNONS -

Levures vivantes. Dans les conditions fixées pour la détermination de la valeur mésoxalique, la décarboxylation de l'acide mésoxalique n'est pas mesurable; elle ne le devient, pour la levure haute, qu'après six heures; la transformation produite par la levure basse dans le même temps se montrant plus importante. L'existence d'un temps d'induction n'aurait pas paru improbable si le test au bleu de méthylène de FINK et KUHLES (1) n'avait révélé la présence dans le milieu, après deux heures, de cellules mortes dont le nombre croît en fonction du temps et plus rapidement pour la levure basse que pour la levure haute. La transformation retardée que l'on observe avec la levure vivante paraît donc due à la mise en liberté, après la mort des cellules, du catalyseur que nous avons montré être endocellulaire. Cependant, on ne peut conclure à l'absence stricte de décarboxylation de l'acide mésoxalique par les cellules intactes de levure car il se peut, que, dans nos conditions expérimentales, il n'y ait pas eu pénétration du substrat dans la cellule.

Préparations de levure. (Levures sèches, insolubles de levures autolysées ou tuées par la chaleur, levures dénaturées). Le comportement des préparations de levure est très différent de celui des levures vivantes; leur activité décarboxylante est toujours notable, mais il est vrai que dans tous les cas leur obtention conduit à une destruction de la cellule. La zymine possède une faible valeur mésoxalique; on peut admettre, dans ce cas, qu'une partie des groupes sulfhydrylés protéiques ont réagi avec le groupe carbonyle du solvant (2) utilisé pour l'obtention de cette préparation acétonique de levure.

Autres Champignons. L'activité décarboxylante des espèces étudiées est extrêmement variable et n'atteint jamais de grandes valeurs. L'hyménium est la partie la plus active, ce qui laisse supposer une intervention possible des groupes thiols dans la sporulation. Chez *Panus stipticus*, le catalyseur de décarboxylation est thermolabile; il est thermostable chez *Schizophyllum commune* (3) et son activité augmente par dénaturation thermique. Enfin, *Agaricus campester* est le type de végétal dont le catalyseur n'est que partiellement inactivé par la chaleur.

MOUSSES ET FOUGERES -

Les valeurs mésoxaliques des tiges feuillées et des feuilles non sporulées sont faibles et, en général, assez voisines. *Fontinalis antipyretica*, *Salvinia natans* et *Sphagnum* sp. se séparent toutefois des autres représentants de leur groupe par leur inactivité.

(1) Le réactif de FINK et KUHLES (54, 88) se prépare de la façon suivante : à 100 ml. d'une solution aqueuse de bleu de méthylène à 1/5000, on ajoute 99.75 ml. d'une solution M/5 de phosphate monopotassique et 0.25 ml. d'une solution M/5 de phosphate disodique. A une goutte de suspension aqueuse de levure, on ajoute une goutte de réactif: les cellules mortes se colorent en bleu.

(2) Pour la préparation de l'uréase SUMNER et POLAND (153) ont signalé que l'obtention de l'enzyme cristallisé devait se faire à partir de l'alcool et non de l'acétone afin d'éviter toute interaction avec le solvant.

(3) Nous avons retenu *Schizophyllum commune*, car ce champignon a la propriété d'élaborer des mercaptans à partir de l'ion sulfate (23).

L'examen des organes reproducteurs montre, chez *Funaria hygrometrica*, que la valeur mésoxalique de la capsule est supérieure à celle de la tige feuillée; par contre, chez les Fougères, les feuilles portant les sores n'ont aucune activité.

PHANEROGAMES -

Les résultats sont très variables; de nombreuses espèces présentent une valeur mésoxalique foliaire élevée (*Arum*, *Asparagus*, *Cannabis*, *Ricinus*, *Pisum*, ...), d'autres ne paraissent avoir que des propriétés décarboxylantes très atténuées ou même inexistantes (*Juglans*, *Lemna*, *Galega*, *Piper*..). Des différents organes d'une espèce donnée, la feuille est généralement la plus active (*Arum*, *Petroselinum*, *Pisum*) ; l'activité des racines et des organes de réserve (rhizomes, graines) est négligeable en comparaison.

÷
÷ ÷
÷

CHAPITRE III

EVOLUTION DES PROPRIETES DECARBOXYLANTES

AU COURS DE LA GERMINATION

	Pages
1 - GRAINES ET JEUNES GERMINATIONS	97
a - Germinations obtenues à la lumière et à l'obscurité	97
b - Germinations d'espèces appartenant aux sous-familles des Légumineuses	99
2 - PROPRIETES DECARBOXYLANTES DES ORGANES SEPARES DE GERMINATIONS AGEES DE <i>Canavalia ensiformis</i> .	99
3 - REPERCUSSIONS DE L'ETIOLEMENT SUR L'ACTIVITE DECARBOXYLANTE	101
4 - ACTIVITES COMPAREES DE GERMINATIONS RECOLTEES A DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT , A LA LUMIERE ET A L'OBSCURITE	101
a - Germinations à la lumière	102
b - Germinations à l'obscurité	104
5 - CONCLUSIONS	106

EVOLUTION DES PROPRIETES DECARBOXYLANTES AU COURS DE LA GERMINATION

Les graines ont été mises à germer, à la température de 29-31°, dans du sable humide préalablement lavé et séché à l'étuve à 100°. Avant de procéder à la dessiccation sous vide et, dans tous les cas, les régimes ont été éliminés et les racines soigneusement nettoyées sous un courant d'eau.

I - GRAINES ET JEUNES GERMINATIONS

a - Germinations obtenues à la lumière et à l'obscurité.

Les germinations étudiées présentaient les caractéristiques résumées dans le tableau

55.

TABLEAU 55

Espèces	Germinations (*)	
	à la lumière	à l'obscurité
<i>Linum usitatissimum</i> après 66 heures « 6 jours	4,5 cm. 6,5 cm. (rad. 2,7 cm., hypocot. 3,8 cm.)	4,5 cm. 13,5 cm. (rad. 4 cm., hypocot. 9,5 cm.)
<i>Cannabis sativa</i> après 20 heures « 5 jours	2,0 cm. 7 cm. (rad. 4,5 cm., hypocot. 2,5 cm.)	2,0 cm. 8,8 cm. (rad. 3,8 cm., hypocot. 5 cm.)
<i>Canavalia ensiformis</i> après 48 heures « 7 jours	radicule de 2 cm. plantule avec hypocot. de 5 cm.	radicule de 2 cm. plantule avec hypocot. de 25 cm.
<i>Zea Mays</i> après 7 jours	feuilles enroulées mesurant 10 cm.	mésocotyle de 6 cm, coléoptyle dépassant le mésocotyle de 4 cm. et feuilles enroulées dépassant le coléoptyle de 4 cm.

rad. = radicule, hypocot. = hypocotyle.

(*) . Les dimensions données sans spécification caractérisent les germinations dans leur entier. Pour *Canavalia ensiformis*, la radicule est seule apparente après 48 heures. Après 5, 6 ou 7 jours de germination, le développement des épicotyles est pratiquement nul ; aussi, avons-nous indiqué simplement la longueur des hypocotyles.

Les valeurs mésoxaliques trouvées figurent dans les tableaux 56 et 57.

TABLEAU 56

Espèces	Valeurs mésoxaliques (lumière)					
	Graines	Germinations				
		entières	plantules -cotylédons	cotylédons ou albumen	feuilles	racines
<i>Linum usitatissimum</i>	1,6	-	-	-	-	-
après 66 heures	-	9,8	-	-	-	-
« 6 jours	-	18,9	-	-	-	-
<i>Cannabis sativa</i>	5,5	-	-	-	-	-
après 20 heures	-	9,3	-	-	-	-
« 5 jours	-	18,5	-	-	-	-
<i>Canavalia ensiformis</i>	6,1	-	-	-	-	-
après 48 heures	-	7,3	-	-	-	-
« 7 jours	-	-	13,2	7,3	-	-
<i>Zea Mays</i>	0,9	-	-	-	-	-
après 7 jours	-	-	-	0,9	9,2	5,8

TABLEAU 57

Espèces	Valeurs mésoxaliques (obscurité)					
	Graines	Germinations				
		entières	plantules -cotylédons	cotylédons ou albumen	feuilles	racines
<i>Linum usitatissimum</i>	1,6	-	-	-	-	-
après 66 heures	-	9,8	-	-	-	-
« 6 jours	-	13,5	-	-	-	-
<i>Cannabis sativa</i>	5,5	-	-	-	-	-
après 20 heures	-	8,1	-	-	-	-
« 5 jours	-	15,0	-	-	-	-
<i>Canavalia ensiformis</i>	6,1	-	-	-	-	-
après 48 heures	-	7,3	-	-	-	-
« 7 jours	-	-	7,1	5,9	-	-
<i>Zea Mays</i>	1,0	-	-	-	-	-
après 7 jours	-	-	-	1,1	2,8	5,0

Au cours de la germination, on constate une exaltation des propriétés décarboxylantes qui est plus marquée à la lumière qu'à l'obscurité. La décarboxylation par les différentes parties des plantules de *Zea Mays* et de *Canavalia ensiformis* montre encore que les organes en voie de croissance possèdent une activité maximum; la valeur mésoxalique du tissu nourricier, qu'il s'agisse d'un albumen ou de cotylédons est, comparativement, toujours plus faible.

b - Germinations d'espèces appartenant aux sous-familles des Légumineuses -

Toutes les germinations ont été effectuées à la lumière ; les résultats sont consignés dans le tableau 58.

TABEAU 58

Espèces	Valeurs mésoxaliques				
	Graines	Germinations			
		âge	entières	plantules cotylédons	cotylédons
Papilionées					
<i>Lupinus albus</i> L.	8,5	7 j.	-	11,0	12,1
<i>Pisum sativum</i> L.	6,4	4 j.	-	11,6	8,2
<i>Canavalia ensiformis</i> D.C.	6,1	7 j.	-	13,2	7,3
Césalpiniées					
<i>Poinciana regia</i> Boj. ex D.C.	10,9	15 j.	-	8,4	11,8
<i>Peltophorum ferrugineum</i> Benth.	4,3	16 j.	7,7	-	-
<i>Cassia occidentalis</i> L.	7,2	9 j.	17,0	-	-
Mimosées					
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> Gris.	7,9	15 j.	-	11,8	9,8
<i>Desmanthus virgatus</i> Willd.	7,9	14 j.	8,5	-	-
<i>Mimosa pudica</i> L.	8,9	13 j.	17,4	-	-
« <i>asperata</i> L.	3,5	13 j.	6,2	-	-
<i>Leucaena glauca</i> Benth.	8,7	16 j.	10,9	-	-

Cette étude rend compte du comportement très variable des espèces d'une même famille . La germination s'accompagne d'une augmentation considérable de l'activité décarboxylante (*Canavalia ensiformis* , *Cassia occidentalis* , *Mimosa pudica*) ou modifie peu celle présentée initialement par la graine (*Poinciana regia* , *Desmanthus virgatus*) ; des différences notables s'observent entre espèces d'un même genre (*Mimosa pudica* et *Mimosa asperata*) .

2 - VALEUR MESOXALIQUE DES ORGANES SEPARES DE GERMINATIONS AGEES
DE CANAVALIA ENSIFORMIS

Nous avons montré , pour les germinations développées à la lumière, que l'ensemble : racine, tigelle et gemmule, présente par rapport aux cotylédons une valeur mésoxalique élevée . L'examen séparé des différents organes de germinations âgées devrait, en conséquence, permettre de préciser où se localise plus particulièrement le catalyseur . Les essais, réalisés avec *Canavalia ensiformis* , ont conduit aux résultats figurant dans le tableau 59 .

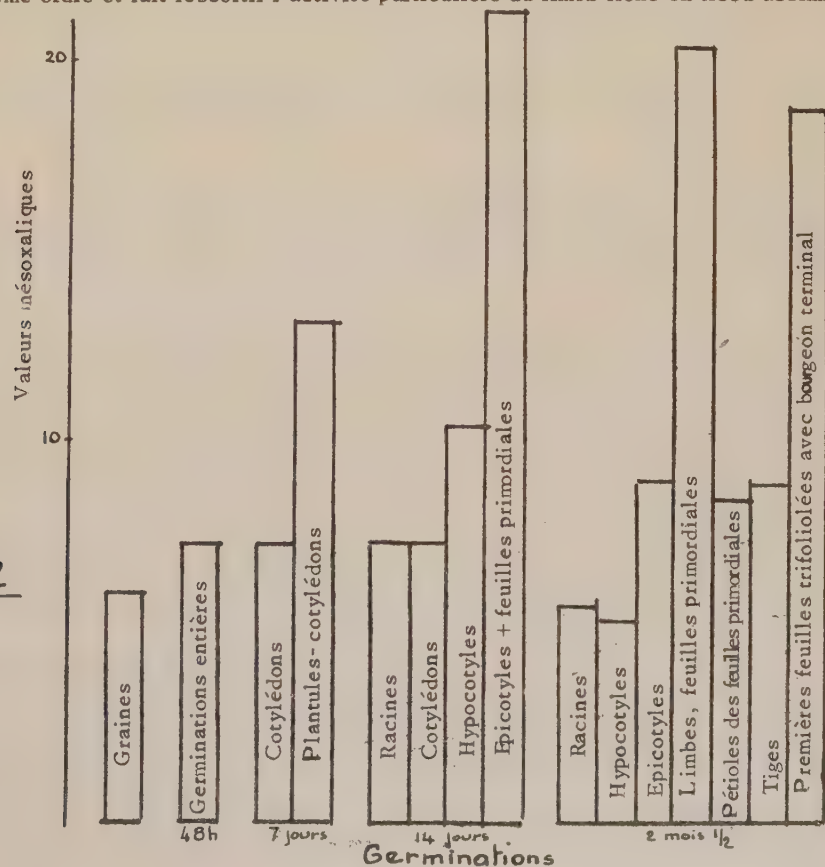
TABEAU 59

<i>Canavalia ensiformis</i>	V.Mx		Valeurs mésoxaliques (Germinations)									
	Graines	Entières	Plantules - cotylédons	Cotylédons	Racines	Hypocotyles	Tiges épicotylées + feuilles primordiales + bourgeon	Tiges épicotylées	Feuilles primordiales		Tige (1er entre-noeud)	1er feuilles unifoliolées avec bourgeon
									Limbes	Pétioles		
Graines	6,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Germinations 48 h.	-	7,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
« 7 j.	-	-	13,2	7,3	-	-	-	-	-	-	-	-
« 14 j.	-	-	-	7,2	7,2	10,4	21,3	-	-	-	-	-
« 75 j.	-	-	-	*	5,7	5,3	-	8,9	20,4	8,5	8,8	18,8

* Après deux mois et demi de germination, les cotylédons sont flétris et tombés.

Après 14 jours de germination, l'activité décarboxylante des cotylédons est inchangée. Par contre, l'ensemble : tige épicotylée - feuilles primordiales - bourgeon présente une valeur mésoxalique élevée et très supérieure à celle de l'hypocotyle et des racines. L'examen des germinations, âgées de deux mois et demi, conduit à des résultats du même ordre et fait ressortir l'activité particulière du limbe riche en tissu assimilateur (figure 12).

Figure 12



3 - REPERCUSSION DE L'ETIOLEMENT SUR L'ACTIVITE DECARBOXYLANTE

Afin de compléter les résultats précédemment acquis, nous avons cherché à connaître les modifications qu'apporte un séjour à l'obscurité de plantules de *Zea Mays* obtenues à la lumière. Inversement, nous avons soumis à la lumière des plantules développées primitivement à l'obscurité. Toutes les germinations présentaient trois feuilles bien développées; elles ont été sectionnées au niveau du mésocotyle et les valeurs mésoxaliques déterminées uniquement sur les feuilles (tableau 60),

TABLEAU 60

Germinations de <i>Zea Mays</i>	Valeurs mésoxaliques
22 j. de développement à la lumière	6,9
« « « , puis 8j. à l'obscurité	2,5
11 j. de développement à l'obscurité	2,5
« « « , puis 5j. à la lumière	5,5

L'étiollement a pour conséquence une diminution de l'activité mésoxalique; l'expérience, où la croissance de plantules initialement chlorophylliennes se poursuit à l'obscurité, le montre clairement. L'augmentation du pouvoir décarboxylant, après exposition au jour de plantules étiolées, le confirme et attire l'attention sur le rôle favorisant de la lumière dans le développement des propriétés décarboxylantes.

4 - ACTIVITES COMPAREES DE GERMINATIONS

RECOLTEES A DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT , A LA LUMIERE ET A L'OBSCURITE

La seule connaissance de la valeur mésoxalique, qui s'exprime par rapport à un poids, est insuffisante pour suivre l'évolution des propriétés décarboxylantes. Au début de la germination, en effet, la jeune plantule est le siège de phénomènes d'oxydo-réduction intenses conduisant à une perte de poids, dont il ne peut être tenu compte que par le calcul de l'activité rapportée à 100 plantules. Pour cela, nous avons opéré sur des lots de graines de même poids (à 2% près), en retenant pour chaque lot un nombre de graines suffisant pour pouvoir effectuer un ensemble complet de déterminations à différents stades de développement. Un lot a été mis à germer à la lumière et un à l'obscurité. Pour chaque espèce, nous avons déterminé l'activité mésoxalique :

- des graines privées de leurs enveloppes (stade I),
- des jeunes germinations où seule la radicule est apparente (stade II),
- des germinations plus âgées en détachant les cotylédons de la plantule (stade III),

- Enfin, des germinations à plantule suffisamment développée pour permettre l'examen de la tige épicotylée avec feuilles et gemmule, de l'hypocotyle, du système racinaire et du tissu nourricier résiduel (stage IV).

L'étude a porté sur *Lupinus albus* et sur *Canavalia ensiformis*.

GERMINATIONS A LA LUMIERE

a - Caractéristiques morphologiques des germinations - *Lupinus albus* :

- Stade I Graines, poids moyen 408 mg., téguments 17,6%, humidité 7,9 %
- Stade II Germinations de 48 heures présentant une racine de 3cm. environ, apparition du pigment chlorophyllien.
- Stade III Germinations de 7 jours. La racine de 13 cm. environ porte des radicelles peu développées ; l'hypocotyle mesure 6cm, il est légèrement verdâtre ; la tige épicotylée avec la gemmule et les premières feuilles atteint 3cm. et les feuilles dépassent les cotylédons de 1,5 cm environ. Les cotylédons très chlorophylliens commencent à s'étaler.
- Stade IV Germinations de 14 jours. Le système racinaire comprend une racine principale de 15cm. environ couverte de nombreuses radicelles. L'hypocotyle mesure approximativement 10cm, il est légèrement verdâtre. La tige épicotylée porte des feuilles qui atteignent sensiblement 6cm. Les cotylédons épanouis sont riches en chlorophylle.

Canavalia ensiformis.

- Stade I Graines, poids moyen 1230 mg., téguments 19,5 %, humidité 6,2 %.
- Stade II Germinations de 48 heures. L'axe hypocotylé chlorophyllien mesure 5 cm. La racine de 6 cm. porte de nombreuses radicelles. Les feuilles primordiales encore pliées apparaissent entre les cotylédons verts qui commencent à s'étaler. La tige épicotylée est inexistante.
- Stade III Germinations de 14 jours. La racine principale atteint 14 cm, l'axe hypocotylé 10 cm. et la tige épicotylée 6 cm. Les cotylédons sont épanouis et déjà marqués par un début de flétrissement. Les feuilles primordiales unifoliolées présentent un pétiole long de 4,5 cm et un limbe de 4,5/3,5 cm.

b - Résultats -

Ils sont consignés dans le tableau 61,

TABLEAU 61

Organes	Poids en mg. de 100 individus secs	Valeur mésoxalique	Activité mésoxalique en U.Mx pour 100 individus		
			Organes séparés	Plante totale	Variations%
Lupinus Albus					
Graines sans téguments	31.435	8,5	-	26,7	-
Germinations de 48h.	30.540	9,1	-	27,8	+ 4,1
Germinations de 7 jours	27.639	-	-	32,5	+ 21,7
Plantules (-cotylédons)	9.422	11,0	10,4	-	
Cotylédons	18.217	12,1	22,1	-	
Germinations de 14 jours	24.901	-	-	33,7	+ 26,2
Racines	2.548	6,2	1,6	-	
Hypocotyles	6.125	8,1	5,0	-	
Epicotyles + feuilles + bourgeons	4.581	18,3	8,4	-	
Cotylédons	11.647	16,0	18,7	-	
Canavalia Ensiformis					
Graines sans téguments	95.917	6,1	-	58,5	
Germinations de 48 h.	90.870	7,3	-	66,3	+ 13,3
Germinations de 7 jours	85.861	-	-	70,4	+ 20,3
Plantules (-cotylédons)	13.085	13,2	17,3	-	
Cotylédons	72.766	7,3	53,1	-	
Germinations de 14 jours	73.906	-	-	85,5	+ 46,2
Racines	9.681	7,1	6,9	-	
Hypocotyles	14.583	10,0	14,6	-	
Epicotyles + feuilles + bourgeons	20.220	21,3	43,1	-	
Cotylédons	29.422	7,1	20,9	-	

La comparaison des valeurs mésoxaliques montre que l'ensemble : tiges épicotylées-feuilles-bourgeons, présente l'activité décarboxylante maximum. Le calcul, fait pour 100 individus, indique une augmentation par rapport à la graine d'autant plus accusée que les germinations sont plus âgées : 26 % après 14 jours pour *Lupinus albus* et 46 % pour *Canavalia ensiformis*.

Les cotylédons constituent une « réserve en catalyseur » (germinations de 7 jours). Le cas de *Canavalia ensiformis* est particulièrement net car, si la valeur mésoxalique des cotylédons est inférieure à celle des plantules privées de leurs cotylédons, 100 cotylédons n'en renferment pas moins 55 unités mésoxaliques contre 17 pour 100 plantules ; pour *Lupinus albus*, l'écart est moins sensible. Après 14 jours, la perte de poids des cotylédons est importante, ce qui justifie le peu d'unités mésoxaliques contenues dans 100 cotylédons.

GERMINATIONS A L'OBSCURITE

a - Caractéristiques morphologiques des germinations -

Lupinus albus .

- Stade I. Graines, poids moyen 344 mg., téguments 19,1 % , humidité 8,1 % .
- Stade II Germinations de 48 heures, morphologiquement semblables à celles obtenues à la lumière mais dépourvues de chlorophylle .
- Stade III Germinations de 7 jours . La racine de la plantule mesure 9 cm. environ et l'hypocotyle 11cm. La tige épicotylée est à peine développée , elle porte 2 feuilles jaunâtres , pratiquement sessiles, cachées par les cotylédons qui ne s'épanouissent pas et qui sont jaunâtres.
- Stade IV Germinations de 18 jours . Le système racinaire, peu abondant, atteint 10 cm. environ et l'hypocotyle 18cm. La tige épicotylée et les feuilles (pétioles de 2mm. au maximum) achlorophylliennes restent incluses entre les cotylédons non épanouis .

Canavalia ensiformis .

- Stade I Graines, poids moyen 1034 mg. , téguments 23,2 % , humidité 6,4 % .
- Stade II Germinations de 48 heures. Aspect morphologique identique à celui des germinations développées à la lumière .
- Stade III Germinations de 7 jours . Le développement de l'hypocotyle est très marqué (longueur 25cm. environ) . Les cotylédons jaunâtres s'écarterent légèrement en laissant passer les deux feuilles primordiales (limbe 2,5/1,7 cm, pétioles : 1cm , tige épicotylée nulle) . Système racinaire assez abondant .
- Stade IV Germinations de 12 jours . L'axe hypocotylé continue à s'allonger ((30 cm environ) . La tige épicotylée se développe (8 à 10 cm.) , feuilles primordiales : limbe 3/2 cm ; pétiole : 1,5 cm , gemmule nettement apparente .

b - Résultats :

Ils sont consignés dans le tableau 62 .

TABLEAU 62

Organes	Poids en mg. de 100 individus secs	Valeur mésoxalique	Activité mésoxalique en U. Mx pour 100 individus		
			Organes séparés	Plante totale	Variations %
<i>Lupinus Albus</i>					
Graines sans téguments	26.438	8,9	-	23,5	
Germinations de 48 heures	24.942	9,8	"	24,4	+ 3,8
Germinations de 7 jours	23.970	-	"	20,9	- 11,0
Plantules (-cotylédons)	11.357	6,5	7,4	-	
Cotylédons	12.613	10,7	13,5	-	
Germinations de 18 jours	18.222	-	"	16,7	- 29,0
Racines	1.678	4,9	0,8	-	
Hypocotyles	11.057	7,9	8,7	-	
Epicotyles + feuilles + bourgeons	500	12,1	0,6	-	
Cotylédons	4.987	13,3	6,6	-	
<i>Canavalia Ensiformis</i>					
Graines sans téguments	70.924	6,1	-	43,3	
Germinations de 48 heures	66.723	7,3	"	48,7	+ 12,5
Germinations de 7 jours	63.944	-	"	42,0	- 3,0
Plantules (-cotylédons)	34.876	7,1	24,8	-	
Cotylédons	29.068	5,9	17,2	-	
Germinations de 12 jours	47.004	-	"	37,4	- 13,6
Racines	4.801	8,2	3,9	-	
Hypocotyles	21.466	6,3	13,5	-	
Epicotyles + feuilles + bourgeons	10.796	11,0	11,9	-	
Cotylédons	9.941	8,1	8,1	-	

A l'obscurité, le développement de la plantule s'accompagne d'une augmentation de la valeur mésoxalique surtout manifeste pour l'ensemble : tiges épicotylées-feuilles-bourgeons. Il n'existe pas de différences marquées entre la valeur mésoxalique des cotylédons et celle de la tige épicotylée, ainsi qu'on le constate dans le cas des germinations obtenues à la lumière. Dans les premiers stades de la germination, la valeur mésoxalique des cotylédons de *Lupinus albus* est nettement supérieure à celle des plantules privées de leurs cotylédons. Pour *Canavalia ensiformis*, la valeur mésoxalique des cotylédons reste toujours plus faible que celle des plantules dépourvues de leurs cotylédons. Quoi qu'il en soit, l'évolution des propriétés décarboxylantes est identique pour les deux espèces : le nombre d'unités mésoxaliques contenues dans 100 plantules est supérieur, dans les débuts de la germination, à celui déterminé pour 100 graines ; il va ensuite en diminuant.

5 - CONCLUSIONS

L'apparition de nouveaux groupes thiols au cours de la germination, constatée par différents auteurs, par les réactions au nitroprussiate, au ferricyanure et par le dosage à l'iode, est encore confirmée par la détermination de la valeur mésoxalique. Nous constatons une élévation du pouvoir décarboxylant au début de la germination, à la lumière comme à l'obscurité, et les interprétations que l'on peut en donner sont diverses. Il peut y avoir réduction des ponts disulfures : SOUTOULOV (144) travaillant sur de jeunes germinations de *Lupinus luteus*, obtenues à l'obscurité, pense qu'il en est ainsi car le clivage en peptides est faible. L'apparition de groupes SH peut aussi résulter d'une dénaturation de la molécule protéique : LINDERSTROM-LANG, HOTCHKISS et JOHANSEN (105) estiment, en effet, que ce phénomène doit précéder obligatoirement l'hydrolyse enzymatique. Il peut aussi se former du glutathion : HOPKINS et MORGAN (81), FIRKET et COMHAIRE (55), KRETOVITCH, BUNDEL et DROZDOVA (97) l'ont constaté et ont montré que la teneur en tripeptide, après avoir atteint rapidement un maximum, diminue ensuite. A ces possibilités, on peut ajouter l'apparition éventuelle de groupes thiols aux dépens de composés alkylés (méthionine) et envisager aussi leur synthèse à partir du soufre minéral.

Les graines, à l'état de repos, n'ont jamais une activité mésoxalique très marquée et, bien que les propriétés décarboxylantes soient exaltées au début de la germination, l'examen des organes séparés de germinations âgées de *Canavalia ensiformis* montre que les limbes (feuilles primordiales et normales) possèdent la valeur mésoxalique la plus élevée. Doit-on envisager une synthèse au niveau des organes foliaires ou penser à une migration du catalyseur, après simplification moléculaire ? Les résultats de l'étude des germinations de *Canavalia ensiformis*, âgées de deux mois et demi, plaideraient en faveur de cette dernière hypothèse. En effet, les valeurs mésoxaliques de l'hypocotyle et de la tige épicotylée diminuent, d'une façon considérable et toute l'activité se concentre dans les feuilles ; la tige et les pétioles qui ont une faible valeur mésoxalique ne renfermeraient alors que transitoirement le catalyseur. Cette conception du transport du catalyseur, après simplification moléculaire, est étayée par les travaux de HEVESY, LINDERSTROM-LANG, KESTON et OLSEN (77) : les protéines, une fois formées, ne sont pas dans un état statique, elles subissent constamment des scissions suivies de recombinaisons. Il serait cependant prématuré de conclure à une simple migration, car l'examen simultané de germinations obtenues à la lumière et à l'obscurité laisse entrevoir l'importance de l'éclairement dans le développement des propriétés décarboxylantes : la valeur mésoxalique d'organes homologues est, en effet, toujours plus accusée pour ceux se formant à la lumière ; l'étude des répercussions de l'étiollement sur l'activité mésoxalique en apporte une confirmation.

Examinons simultanément les données fournies par la connaissance de la valeur mésoxalique et par le calcul de l'activité de cent plantules. Les valeurs mésoxaliques les plus élevées se rencontrent chez les ensembles : tiges épicotylées-feuilles-bourgeons, à la lumière comme à l'obscurité, mais les valeurs obtenues pour les germinations étiolées n'atteignent jamais les chiffres qui caractérisent les germinations développées à la lumière ; il semble donc qu'il existe une relation entre la présence du pigment chlorophyllien et l'activité dé-

décarboxylante . A la lumière, le nombre d'unités mésoxaliques contenues dans cent plantules augmente considérablement ; par contre , à l'obscurité, l'activité , qui est légèrement supérieure à celle des graines initiales dans les premiers stades , diminue ensuite . Ceci laissé penser que les germinations étiolées perdent la possibilité de synthétiser des groupes thiols ; de plus, pour expliquer la diminution constatée, on peut admettre que les groupes thiols qui existent primitivement dans la graine, disparaissent , ou que leur réactivité vis-à-vis de l'acide mésoxalique est modifiée .



CHAPITRE IV

PROPRIETES DECARBOXYLANTES DES VEGETAUX
SE DEVELOPPANT DANS LEUR MILIEU NATUREL

	Pages
1 - EXAMEN DE QUELQUES PLANTES TERRESTRES A VEGETATION ANNUELLE ET D'ARUM MACULATUM	109
2 - PROPRIETES DECARBOXYLANTES DES CLADODES ET DES TIGES ASSIMILATRICES	113
3 - DECARBOXYLATION DE L'ACIDE MESOXALIQUE PAR LES VEGETAUX AQUATIQUES ET SEMI-AQUATIQUES	115
4 - CONCLUSIONS	116

PROPRIETES DECARBOXYLANTES DES VEGETAUX
SE DEVELOPPANT DANS LEUR MILIEU NATUREL

I - EXAMEN DE QUELQUES PLANTES TERRESTRES A VEGETATION ANNUELLE
ET D'ARUM MACULATUM

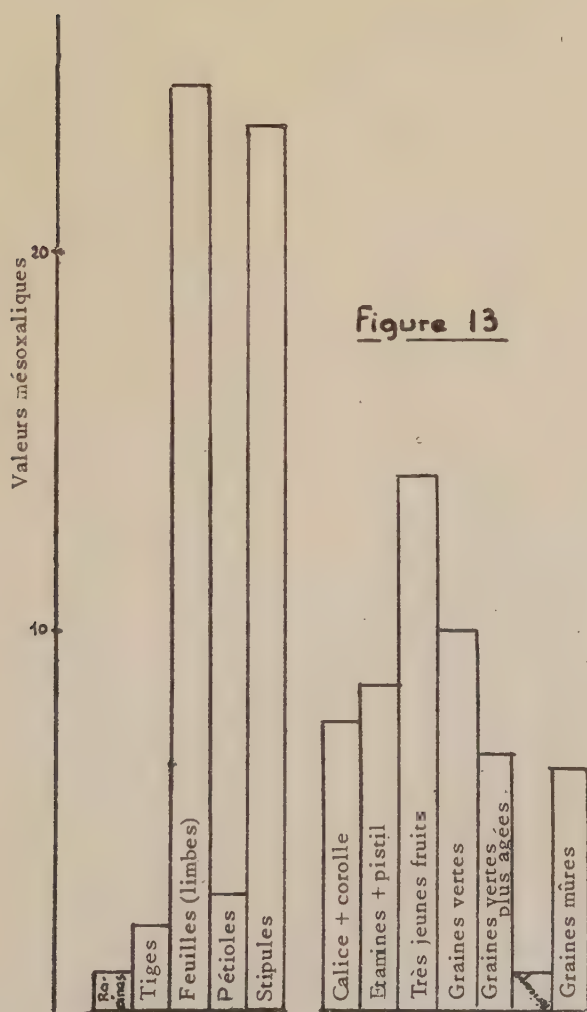
Les résultats intéressent les espèces ci-après récoltées en 1953 : *Pisum sativum*, *Linum usitatissimum*, *Cannabis sativa*, *Ricinus communis* et *Arum maculatum* (Tableau 63)

TABEAU 63

Organes végétatifs*	V. Mx	Organes de reproduction	V. Mx
<i>PISUM SATIVUM</i>			
Racines	1,0	Calice + corolle	7,6
Tiges	2,2	Etamines + pistil	8,6
Feuilles, limbes	24,3	Très jeunes fruits (3 cm. environ)	14,1
« « étiolés	2,0	Graines vertes (3mm. environ)	10,0
« « , pétioles	3,0	Fruits avec graines vertes	
Stipules	23,3	à complet développement, graines non mûres	6,7
		« « , péicarpes	1,0
		Graines mûres	6,4
<i>LINUM USITATISSIMUM</i>			
Racines	0	Fleurs	9,2
Tiges	0	Fruits verts (3 à 5mm.)	2,3
Feuilles	10,3	Fruits à graines bien formées, graines non mûres	3,2
« « , étiolées	0	« « « « , péicarpes	1,1
		Graines mûres	1,6
<i>CANNABIS SATIVA</i>			
Racines	2,0	Fleurs mâles	6,9
Tiges	3,2	Graines mûres	5,5
Feuilles	13,6		
<i>RICINUS COMMUNIS</i>			
Racines	0	Fleurs femelles	4,0
Tiges	1,2	« mâles	1,1
Feuilles, limbes	19,6	Fruits verts âgés, graines non mûres	**
« « , pétioles	3,3	« « « « , péicarpes	0
		Graines mûres	**
<i>ARUM MACULATUM</i>			
Racines	6,4	Axe d'inflorescence, partie dénudée	3,0
Rhizome	3,0	Fleurs femelles	28,6
Feuilles, limbes	30,5	Fleurs mâles et portion de l'axe d'inflorescence	36,2
Feuilles, limbes étiolés	4,3	Fleurs stériles et sommet de l'inflorescence	25,3
« « , pétioles	5,0	Jeunes fruits à graines non séparables	30,0
Spathe	10,9	Fruits verts plus âgés, graines non mûres	3,5
		« « « « , péicarpes	21,4
		« « âgés (1cm/0,8cm avec graines(3,5/5mm)	4,2
* Les valeurs mésoxaliques ont été déterminées sur les organes prélevés au moment de la floraison.			
** Les déterminations n'ont pu être effectuées par suite de la teneur élevée de la graine en lipides			

Pour l'ensemble des espèces étudiées, l'activité décarboxylante du système foliaire est intense par rapport à celle des autres organes de l'appareil végétatif; l'examen séparé du pétiole et du limbe montre que le catalyseur se localise dans ce dernier. Les stipules de *Pisum sativum* se comportent comme les limbes; la spathe d'*Arum* qui est chlorophyllienne possède également des propriétés décarboxylantes. L'étiollement conduit à une perte pratiquement totale de l'activité.

En ce qui concerne les organes de reproduction, l'activité maximum, chez *Pisum sativum*, s'observe après la fécondation dans le jeune fruit. Par la suite, l'examen du fruit fait ressortir l'enrichissement relatif de la graine par rapport au péricarpe dont l'activité devient négligeable. Enfin, la valeur mésoxalique de la graine diminue au cours de la maturation (Figure 13).



Chez *Linum usitatissimum*, les fleurs ont une activité décarboxylante supérieure à celle des jeunes fruits; la valeur mésoxalique des graines non mûres est plus élevée que celle du péricarpe, et la maturation s'accompagne d'une perte d'activité comme pour le pois.

Les résultats obtenus, pour *Cannabis sativa*, soulignent encore l'activité décarboxylante limitée de la graine en comparaison de celle présentée par la feuille; ceux se rapportant à *Ricinus communis* mettent en évidence la faible valeur mésoxalique des organes reproducteurs.

Arum maculatum (Figure 14, voir page suivante) se distingue par les propriétés décarboxylantes très accusées des fleurs et des jeunes fruits. L'examen des fruits verts, prélevés à un stade intermédiaire de maturation, montre qu'il y a déjà une perte sensible d'activité, perte qui va en s'accusant lorsque la plante arrive en fin de végétation.

Une étude plus détaillée d'*Arum maculatum* a été faite en suivant la végétation au long de l'année 1954. Les stades de récolte furent les suivants :

Jeunes Arums .

Stade A Très jeunes plantules : 3 cm, achlorophylliennes ou très légèrement chlorophylliennes.

Stade B Jeunes arums à feuilles enroulées contenues dans la gaine.

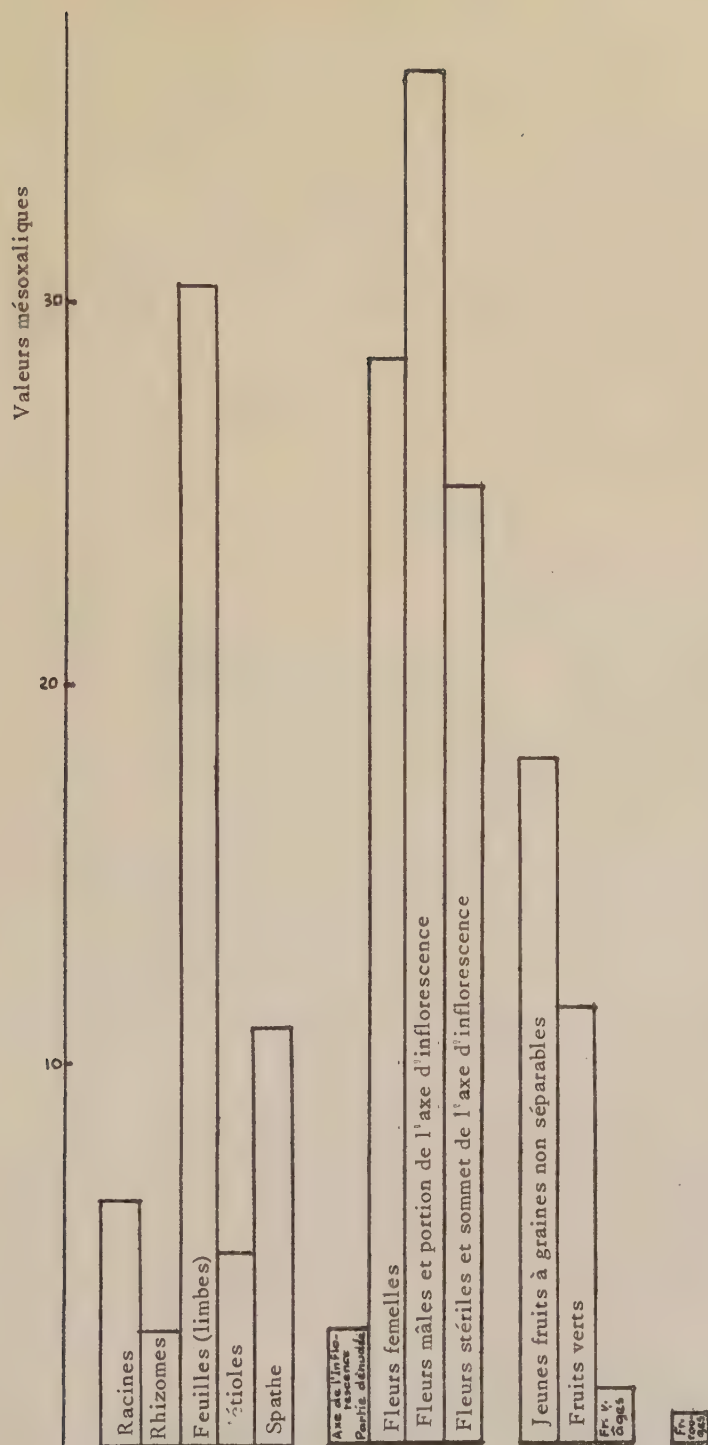


Figure 14

Arums en floraison .

Stade C Arums à feuilles bien développées et à inflorescence protégée par la spathe enroulée. La partie dénudée de l'axe mesure 4 cm. environ, celle portant les fleurs 3 à 3,5 cm. et la spathe 4 à 5 cm.

Stade D Arums à inflorescence non encore apparente. Fleurs mâles non en anthèse; la partie dénudée de l'axe mesure 8 à 10 cm. , celle portant les fleurs 4 à 5 cm. et la spathe vert-clair 6 à 8 cm.

Stade E Arums à feuilles vertes, à spathe déroulée turgescence. Fleurs mâles en anthèse. La partie dénudée de l'axe mesure 15 à 18 cm. , celle portant les fleurs 7 à 8 cm.

Arums en fructification .

Stade F Arums à feuilles vertes et à très jeunes fruits; spathe flétrie.

Stade G Arums à feuilles encore vertes; les fruits de grosseur moyenne mesurent 0,5 / 0,4 cm. et 0,7 / 0,5 cm.

Stade H Arums à feuilles jaunâtres. Fruits de 0,6 / 0,8 cm. à graines bien formées.

Stade I Fruits verts plus âgés que les précédents.

Stade J Fruits rouges .

Les résultats sont consignés dans le tableau 64 .

TABLEAU 64

<i>Arum maculatum</i>	Valeurs mésoxaliques aux différents stades de récolte									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Très jeunes plantes	15,1									
Racines		6,1								
Rhizome 1953		0								
« 1954		5,9								
Gaine, part. blanche		6,1								
« « verte		12,2								
Limbe			29,7	25,3	17,4	16,9	12,1	6,7		
« , f. interne		34,5								
« , f. externe		37,5								
Pétiole		13,5								
Spathe		17,1	15,7	15,2	7,1					
Inflor. (spadice)		21,9	19,3							
Fleurs femelles				16,9	23,8					
« mâles et axe qui les porte				19,8	24,8					
« stériles et sommet axe inflor.				14,9	20,3					
Partie dénudée de l'axe d'inflor.		15,1	9,3	2,7	1,7	4,7	2,5	0		
Jeunes fr. à graines non séparab.						18,1				
Fr. verts plus âgés entiers							11,5	12,5	1,5	
péricarpes							16,6	10,9	4,0	
graines non mûres							8,1	3,0	1,7	
partie de l'axe qui porte les fruits							11,7	6,1		
Fr. rouges entiers										0,8
péricarpes										3,7
graines										1,9

Les valeurs mésoxaliques les plus élevées, que nous ayons notées au cours de la végétation, s'observent au stade B de la récolte, aussi bien pour les organes végétatifs que pour les organes de reproduction. Au stade A, les très jeunes plantules décarboxylent activement l'acide mésoxalique mais, cependant, la valeur trouvée est très inférieure à celles qui caractérisent *Arum maculatum* récolté au stade suivant. Cette augmentation de l'activité peut se justifier par une exaltation du métabolisme des composés thiols pendant la période de croissance, phénomène constaté à plusieurs reprises par M. GOAS⁽¹⁾.

Après avoir atteint un maximum, la valeur mésoxalique foliaire va en diminuant (stades C à H) et, chez les feuilles jaunissantes (Stade H), le pouvoir décarboxylant est considérablement diminué. Toutefois, pour comparer les activités foliaires, il importait d'exprimer les résultats, non plus en valeurs mésoxaliques, c'est à dire

(1) . Communication personnelle .

Year	Month	Day	Time	Location	Remarks
1900	1	1	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	2	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	3	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	4	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	5	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	6	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	7	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	8	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	9	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	10	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	11	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	12	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	13	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	14	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	15	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	16	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	17	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	18	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	19	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	20	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	21	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	22	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	23	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	24	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	25	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	26	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	27	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	28	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	29	10:00	St. Paul	Arrived
1900	1	30	10:00	St. Paul	Departed
1900	1	31	10:00	St. Paul	Arrived

par rapport à un poids, mais par le nombre d'unités mésoxaliques contenues par m² de surface foliaire, afin de tenir compte des variations de poids de la feuille au cours du développement (Tableau 65)

TABEAU 65

Stades de récolte	Poids sec de 1 m ² de feuille	Valeurs mésoxaliques	Unités mésoxaliques par m ² de feuille
C	29,8 g.	29,7	88
D	35,2	25,3	88
E	26,8	17,4	42
F	24,0	16,9	40
G	24,9	12,1	30
H	17,3	6,7	12

Quand on passe du stade C au stade D, le poids du m² de surface foliaire augmente alors que la valeur mésoxalique diminue ; en fait, les résultats rapportés à la surface foliaire montrent que le nombre d'unités mésoxaliques reste identique : il n'y a pas amoindrissement de l'activité décarboxylante. Au stade E, la perte de poids qui caractérise la feuille, va de pair avec la diminution de la valeur mésoxalique, ce qui entraîne une chute considérable du nombre d'unités mésoxaliques par m². On peut se demander s'il existe une relation entre la présence dans les feuilles, de composés thiols susceptibles de décarboxyler l'acide mésoxalique et les phénomènes sexuels dont l'inflorescence est le siège ? A ce sujet, on remarque que la feuille possède avant l'anthèse (stade D) une très forte activité décarboxylante, activité qui diminue considérablement par la suite.

- Une augmentation de la valeur mésoxalique accompagne le développement des différents types de fleurs (stades D et E) : toute l'activité décarboxylante se concentre au niveau des organes floraux ; la valeur mésoxalique de la partie dénudée de l'axe d'inflorescence, élevée dans les premiers stades de la végétation, diminue rapidement ensuite et finit par atteindre une valeur négligeable.

- Les valeurs mésoxaliques, obtenues pour les récoltes de l'année 1954, sont inférieures, dans l'ensemble, à celles présentées par les récoltes de 1953. Néanmoins, l'activité du limbe reste supérieure à celles du pétiole et des autres organes végétatifs ; de même, les fleurs et les jeunes fruits ont toujours des propriétés décarboxylantes marquées et la maturation du fruit s'accompagne d'une perte d'activité aussi bien pour le péricarpe que pour la graine.

2 - PROPRIETES DECARBOXYLANTES DES CLADODES ET DES TIGES ASSIMILATRICES

Les valeurs mésoxaliques trouvées figurent dans le tableau 66.

TABLEAU 66

Espèces étudiées	V. Mx.
<i>Ruscus aculeatus</i> , cladodes	6,5
<i>Danæ racemosus</i> , cladodes	3,8
« « , tige proprement dite	0
<i>Muehlenbeckia platyclada</i> , cladodes	4,3
<i>Colletia spinosa</i> , cladodes	5,4
« « , feuilles	10,4
<i>Asparagus officinalis</i> , cladodes	22,8
<i>Casuarina equisetifolia</i> , tige assimilatrice	10,2
<i>Spartium junceum</i> , tige assimilatrice	6,4
« « « « , écorce	10,1
« « « « , cyl. central	1,8
« « feuilles	14,5

Les organes adaptés aux fonctions d'assimilation se comportent comme des feuilles et présentent des propriétés décarboxylantes variables avec les espèces étudiées . La tige assimilatrice de *Spartium junceum* semble ne renfermer que peu de composés thiols actifs , mais il suffit d'en détacher la mince couche corticale ⁽¹⁾ et d'en déterminer l'activité pour constater que le catalyseur se rencontre dans la zone assimilatrice , à l'exclusion du cylindre central , La valeur mésoxalique trouvée tend alors vers celle des feuilles . Les résultats obtenus pour les cladodes et les tiges assimilatrices peuvent donc être sous-estimés , si la région à tissu chlorophyllien ne représente qu'une faible partie de l'ensemble .

(1) . La décortication conduit à l'enlèvement de l'écorce et de la majeure partie du liber.

3 - DECARBOXYLATION DE L'ACIDE MESOXALIQUE PAR LES VEGETAUX AQUATIQUES ET SEMI-AQUATIQUES

Les résultats sont rapportés dans le tableau 67

TABEAU 67

Espèces étudiées	V. Mx
<i>Chara</i> sp.	0
<i>Fontinalis antipyretica</i> , tiges feuillées	0
<i>Salvinia natans</i>	0
<i>Alisma natans</i> , feuilles flottantes, limbes	22,6
<i>Sagittaria sagittæfolia</i> , feuilles submergées rubanées	négligeable
<i>Potamogeton crispus</i> , feuilles	négligeable
« <i>natans</i> , feuilles flottantes, limbes	2,3
<i>Elodea canadensis</i> , tiges feuillées	3,6
<i>Lemna minor</i> , plantes entières	2,7
<i>Nuphear luteum</i> , limbes	10,9
« « , pétioles	7,1
<i>Callitriche vernalis</i> , feuilles flottantes	8,1
« « , « submergées	0,8
<i>Ceratophyllum demersum</i> , extrémités des rameaux	4,9
<i>Trapa natans</i> , feuilles flottantes , limbes	11,1
« « , jeunes fruits	3,9
<i>Ranunculus aquatilis</i> , feuilles flottantes	10,1
« « « submergées	6,7
« <i>fluitans</i> , « «	4,7
« « , tiges	5,2
<i>Hottonia palustris</i> , extrémités des rameaux	4,0

Les feuilles submergées présentent toujours une très faible activité , Pour *Callitriche vernalis* et *Ranunculus aquatilis* , où nous avons pu examiner les deux types de feuilles , la valeur mésoxalique des feuilles flottantes est élevée par rapport à celle des feuilles submergées,

Pour les autres espèces, les feuilles flottantes ont des activités variant dans de très larges limites (de 2,3 pour *Potamogeton natans* à 22,6 pour *Alisma natans*) mais , comme pour les plantes aériennes , la valeur mésoxalique du limbe reste supérieure à celles du pétiole (*Nuphar luteum*) et du fruit (*Trapa natans*).

4 - CONCLUSIONS

L'étude des germinations a montré qu'à l'apparition du pigment chlorophyllien, correspondait une exaltation des propriétés décarboxylantes se localisant principalement dans les feuilles. Les déterminations effectuées sur les différentes parties d'un végétal se développant dans son milieu naturel font aussi ressortir, pour les organes végétatifs, l'activité mésoxalique intense des limbes. En opposition, les organes de transport comme les tiges et les pétioles, d'absorption comme les racines, de multiplication végétative comme les rhizomes⁽¹⁾ ne présentent jamais de valeurs mésoxaliques élevées. Il en est de même des feuilles en fin de végétation où la destruction du pigment chlorophyllien s'accompagne d'une très importante diminution de l'activité décarboxylante⁽²⁾.

Dans l'ensemble, le comportement des cladodes et des tiges assimilatrices est identique à celui des feuilles : le catalyseur est caractérisable dans l'organe adapté aux fonctions d'assimilation.

Les plantes d'eau se signalent par leur activité décarboxylante généralement faible. On peut penser que le milieu n'est pas sans avoir une certaine influence sur le devenir du catalyseur et des écarts sensibles s'observent dans les valeurs mésoxaliques des différents types de feuilles.

Le catalyseur de décarboxylation se retrouve dans la fleur, dans le jeune fruit et dans la graine. Les mesures d'activité faites au cours du développement du fruit tendent à montrer, en ce qui concerne l'évolution des propriétés décarboxylantes, que la maturation de la graine se présente comme le phénomène inverse de la germination.

÷
÷ ÷
÷

(1) Il en est de même pour les bulbes (Crocus, Tulipe, Jacinthe, Oignon...)(64).

(2) ECHEVIN (50) étudiant le métabolisme du soufre chez les plantes ligneuses à feuilles caduques, constate qu'il n'y a pas migration nette du soufre des feuilles en voie de jaunissement vers les organes vivaces. Il se produirait cependant, dans les feuilles du hêtre, une simplification des composés sulfurés à grosse molécule, dont une partie, au moins, serait oxydée à l'état d'ion sulfate.

CHAPITRE V

PROPRIETES DECARBOXYLANTES DES FEUILLES PANACHEES
ET ACHLOROPHYLLIENNES

	Pages
<i>1 - ACER NEGUNDO</i>	118
a - Valeurs mésoxaliques	118
b - Activités mésoxaliques rapportées à la surface foliaire	119
<i>2 - EVONYMUS EUROPAEUS , SPIRAEA BUMALDA et PELARGONIUM ZONALE</i>	121
<i>3 - CONCLUSIONS</i>	121

PROPRIETES DECARBOXYLANTES DES FEUILLES PANACHEES
ET ACHLOROPHYLLIENNES

La disparition du pigment chlorophyllien, annonçant la fin de la végétation ou provoquée par un séjour à l'obscurité, conduit à une perte considérable de l'activité mésoxalique ; aussi, nous a-t-il paru intéressant d'étudier les propriétés décarboxylantes des feuilles panachées ou atteintes d'albinisme . Nous avons retenu *Acer Negundo* , *Evonymus europaeus* , *Spiraea Bumalda* Anthony Waterer et *Pelargonium zonale* var. Mme SAL-LERON .

I - ACER NEGUNDO

a - Valeurs mésoxaliques

Au cours de l'année 1954, nous avons prélevé les trois types de limbes de la variété à feuilles panachées et examiné comparativement les propriétés décarboxylantes de l'espèce (Tableau 68)

TABLEAU 68

Organes examinés	Valeurs mésoxaliq. (récoltes 1954)						
	1/4	25/5	5/6	12/6	3/8	30/9	9/10
<i>Acer Negundo</i> , var. mâle à feuilles panachées							
Bourgeon foliaire :							
écailles basales	0						
« intermédiaires	3,7						
jeunes feuilles	18,3						
Feuilles adultes (limbes)							
entièrement vertes		13,7	10,3	10,5	8,8	6,3	néglig.
achlorophylliennes		8,1	11,5	11,2	7,1	2,5	0
panachées *		15,9	17,2	15,7	12,0	9,0	2,7
« , part. chlorophyllienne		22,9	19,6	18,9	14,9	14,0	1,5
« , « sans chlorophylle		8,6	11,5	11,8	6,8	4,6	0
<i>Acer Negundo</i> , vert							
Bourgeon foliaire (jeunes feuilles)	18,6						
Feuilles adultes (limbes)		13,2	10,3	10,5	6,2	5,6	0

* Les feuilles retenues présentaient une panachure de l'ordre de 50 %

L'examen des résultats permet quelques remarques générales :

- Au départ de la végétation, toute l'activité mésoxalique se trouve concentrée dans les jeunes feuilles; les écailles sont pratiquement inactives. Les jeunes feuilles ont des possibilités décarboxylantes supérieures à celles des feuilles adultes.
- Les feuilles de l'espèce et les limbes entièrement verts de la variété panachée présentent, dans les premiers stades, des valeurs mésoxaliques sensiblement identiques. Au cours de la végétation, ces valeurs sont sujettes à des variations qui s'effectuent dans le même sens.
- L'examen des propriétés décarboxylantes de la variété panachée montre que les feuilles achlorophylliennes et les parties albinisées des feuilles panachées ont un comportement similaire. Par contre, une différence d'activité notable oppose les feuilles entièrement vertes aux parties chlorophylliennes des feuilles panachées. Enfin, les feuilles panachées ont une activité décarboxylante supérieure à celle des limbes entièrement verts et des limbes achlorophylliens. Leurs valeurs mésoxaliques correspondent sensiblement à la moyenne des valeurs trouvées pour les fractions chlorophylliennes et albinisées.
- Alors que l'arbre est en pleine végétation (récolte d'août), il apparaît déjà une diminution des propriétés décarboxylantes qui intéresse surtout les feuilles et les parties de feuilles achlorophylliennes, diminution qui retentit sur la valeur mésoxalique des feuilles panachées. Par la suite, on constate que le jaunissement automnal s'accompagne d'une perte d'activité qui va en s'accusant et les déterminations, qui sont faites au moment de la chute des feuilles, rendent compte de la disparition pratiquement totale du catalyseur dans les différents types de limbes.

b - Activités mésoxaliques rapportées à la surface foliaire : Les résultats sont consignés dans le tableau 69.

TABLEAU 69

Déterminations effectuées	Acer Negundo					
	variété à feuilles panachées					vert
	Limbes chlorophyl.	Limbes a-chlorophyl.	Limbes panachés	Partie chloroph.	Parties sans chloroph.	Limbes
Poids sec de 1m ²						
Récolte du 25/5	29,6 g.	17,4 g.	24,4 g.	31,9 g.	16,9 g.	32,4 g.
« 5/6	28,4	17,7	23,7	30,7	17,5	31,7
« 12/6	30,5	18,7	24,1	30,5	18,4	31,4
« 3/8	30,1	23,7	33,4	42,5	24,8	30,9
« 30/9	31,7	21,3	29,5	36,5	22,2	31,5
« 9/10	34,7	17,7	22,9	26,8	18,7	34,8
U.Mx par m ²						
Récolte du 25/5	40,5	14,1	38,8	73,2	14,6	42,8
« 5/6	29,3	20,4	40,8	60,2	20,1	32,6
« 12/6	32,0	21,0	38,0	57,7	21,7	32,9
« 3/8	26,5	16,8	40,1	63,4	15,0	19,2
« 30/9	19,9	5,5	26,4	51,4	10,1	17,6
« 9/10	0	0	6,2	4,1	0	0

- Feuilles vertes, de l'espèce et de la variété, et fractions chlorophylliennes des feuilles panachées. Pour les limbes chlorophylliens de l'espèce et de la variété, l'activité décarboxylante

rapportée au m² de surface foliaire ne dépend que de la valeur mésoxalique, puisque le poids de l'unité de surface est sensiblement identique aux différents stades de récolte. Comme la valeur mésoxalique décroît au cours de la végétation, l'activité décarboxylante diminue également.

Pour les fractions chlorophylliennes des feuilles panachées, l'activité décarboxylante est toujours supérieure à celle des feuilles entièrement vertes de l'espèce et de la variété. Les récoltes des 25/5, 5/6 et 12/6/54 font très nettement ressortir cette différence car, à ces stades de la végétation, les poids secs du m² de surface foliaire sont sensiblement les mêmes dans les différents cas.

- Feuilles achlorophylliennes et parties albinisées des feuilles panachées. Les activités, rapportées à l'unité de surface, sont semblables entre elles mais elles restent inférieures à celles présentées par les organes chlorophylliens. Faibles au premier stade de la récolte, car les valeurs mésoxaliques n'ont pas encore atteint leur plus forte valeur, elles passent par un maximum (récoltes du mois de Juin) puis vont en diminuant; au mois d'août, par exemple, et en dépit d'une augmentation du poids de l'unité de surface, les activités sont moins élevées, par suite d'une chute notable de la valeur mésoxalique.

- Feuilles panachées - Comparé à celui des autres feuilles, le comportement des limbes panachés, vis-à-vis de l'acide mésoxalique, est particulier: leur partie chlorophyllienne a une valeur mésoxalique beaucoup plus élevée que celle des feuilles vertes (voir tableau 68) et le fait de rapporter l'activité à l'unité de surface accuse encore cette différence. On remarque, en outre, que l'activité mésoxalique des limbes panachés varie peu au cours de la végétation. Existerait-il pour ces limbes un phénomène compensateur, où la faible activité de la partie albinisée serait équilibrée grâce à l'activité supérieure de la partie riche en chlorophylle? Pour la préparation des échantillons moyens et les déterminations analytiques, nous avons retenu les feuilles présentant une panachure de l'ordre de 50 %; il est donc possible de calculer l'activité que devrait présenter théoriquement 1 m² de limbe panaché après reconstitution. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 70.

TABEAU 70

Dates des récoltes	Nombre d'unités mésoxaliques par m ² (feuilles panachées)	
	Trouvé	Calculé à partir des chiffres obtenus pour les parties chlorophylliennes et achlorophylliennes
24/5/54	38,8	(73,2 + 14,6) : 2 = 43,9
5/6/54	40,8	(60,2 + 20,1) : 2 = 40,1
12/6/54	38,0	(57,7 + 21,7) : 2 = 39,7
3/8/54	40,1	(63,4 + 15,0) : 2 = 39,2
30/9/54	26,5	(51,4 + 10,1) : 2 = 30,7

Les valeurs calculées sont très voisines de celles trouvées expérimentalement pour les feuilles panachées; elles rendent vraisemblable l'existence du processus de compensation dont nous avons envisagé l'hypothèse.

2 - *EVONYMUS EUROPAEUS*, *SPIRAEA BUMALDA* Anthony Waterer
et *PELARGONIUM ZONALE* var. Mme SALLERON

Les résultats concernant ces espèces figurent dans le tableau 71.

TABLEAU 71

Organes examinés	V. Mx (limbes)
<i>Evonymus europaeus</i> (récolte de Juin)	
Feuilles vertes	1,6
« achlorophylliennes	6,2
« panachées	7,5
<i>Spiraea Bumalda</i> (récolte de juin)	
Feuilles vertes	négligeable
« achlorophylliennes	5,5
<i>Pelargonium zonale</i> (récolte de Septembre)	
Feuilles vertes	11,3
« achlorophylliennes	8,9
« panachées (panachure de l'ordre de 50 %)	13,8
« « , fractions chlorophylliennes	17,1
« « , « achlorophylliennes	13,0

Les valeurs mésoxaliques des feuilles albinisées et panachées d'*Evonymus europaeus* et des feuilles achlorophylliennes de *Spiraea Bumalda* sont supérieures à celles des feuilles vertes correspondantes. Pour *Pelargonium zonale*, les limbes chlorophylliens ont des propriétés décarboxylantes plus marquées que les feuilles albinisées ; il en est de même pour les fractions vertes des feuilles panachées comparées aux fractions dépourvues de chlorophylle. L'interprétation des résultats obtenus est difficile car les déterminations portent sur une seule récolte ; à la lumière des résultats fournis par *Acer Negundo*, on se rend compte que seule l'expérimentation sur la végétation d'une année peut renseigner sur l'évolution des propriétés décarboxylantes.

3 - CONCLUSIONS

L'étude des propriétés décarboxylantes des feuilles panachées et achlorophylliennes, fait apparaître que l'albinisme a des répercussions physiologiques tout autres que celles produites par le jaunissement qui marque la fin de la végétation chez les plantes à feuilles caduques : l'absence de pigment chlorophyllien n'abolit pas nécessairement l'activité mésoxalique. Le comportement des espèces est d'ailleurs variable comme le précisent les résultats obtenus avec *Acer Negundo*, *Evonymus europaeus*, *Spiraea Bumalda* et *Pelargonium zonale*.

Chez *Acer Negundo*, l'évolution des propriétés décarboxylantes des feuilles vertes apparaît identique chez l'espèce et chez la variété panachée. Pour les feuilles panachées, l'activité exceptionnelle de la fraction chlorophyllienne rend probable l'existence d'un phénomène compensateur qui maintiendrait à un certain niveau, l'activité du limbe panaché.

L'étude faite sur *Acer Negundo* montre encore qu'une perte générale de l'activité est caractéristique des récoltes d'automne. Jusqu'ici, nous n'avions pu qu'établir un parallélisme entre la destruction du pigment chlorophyllien en fin de végétation et la disparition des propriétés décarboxylantes. L'examen des feuilles albinisées indique que la perte d'activité est aussi en relation étroite avec la protéolyse (41,42), car il n'y a plus ici l'équivoque créée par la présence de chlorophylle.

÷
÷ ÷
÷

CHAPITRE VI

ETUDE COMPAREE DES PROPRIETES DECARBOXYLANTES D'ESPECES APPARTENANT A DIVERSES FAMILLES

	Pages
<i>GRAMINEES</i>	124
<i>ARACEES</i>	125
<i>ACERACEES</i>	126
<i>LEGUMINEUSES</i>	127

ETUDE COMPAREE DES PROPRIETES DECARBOXYLANTES D'ESPECES

APPARTENANT A DIVERSES FAMILLES

(Graminées , Aracées , Acéracées, Légumineuses)

La valeur mésoxalique foliaire a été prise comme test de comparaison des espèces et les déterminations , intéressant les familles précitées, sont consignées dans les tableaux 72, 73, 74 et 75 .

TABLEAU 72

Graminées *	V. Mx (limbes)
<i>Aegilops triuncialis</i> L.	15,3
<i>Avena sativa</i> L. ,avoine noire précocce de Noisy	18,9
« « « souveraine	9,6
<i>Hordeum sativum</i> L. orge inerme	20,6
« « « trifurquée	20,9
<i>Secale cereale</i> L.	23,8
<i>Triticum vulgare</i> Vill. , blé Vilmorin 53	12,6
« « « « 49	15,7
« <i>monococcum vulgare</i> Krck.	17,9
« <i>dicoccum</i> Schübl.	17,9
« <i>turgidum lusitanicum</i> Krck.	16,7
« <i>compactum creticum</i> Mazz.	13,5
« <i>sphaerococcum</i> Perc.	20,9
<i>Zea Mays</i> L.	7,2

* A l'exception de *Zea Mays* (récolte au début de la végétation) , les échantillons ont été prélevés le même jour à la même heure sur les espèces en fructification .

Pour l'ensemble des espèces étudiées, les valeurs mésoxaliques sont généralement élevées . Cependant, on constate des variations assez sensibles, non seulement pour les espèces d'un même genre (*Triticum*) , mais encore pour les variétés (*Avena*) .

TABLEAU 73

Aracées	Valeurs mésoxaliques							
	<i>Arum maculatum</i> L.	<i>Arum italicum</i> L.	<i>Acorus Calamus</i> L.	<i>Anthurium</i> sp.	<i>Calla palustris</i> L.	<i>Colocasia esculenta</i> Schott.	<i>Monstera deliciosa</i> Lieb.	<i>Richardia ethiopica</i> Spreng.
Racines	6,4		0				0	
Rhizomes	3,0		0					
Feuilles, limbes	30,5	19,9	19,6	3,8	12,6	13,7	0	29,0
" , pétioles	5,0	3,1		0,8	0	0	0	
Spathe	10,9		19,6					4,7
Pédoncule floral	3,0							3,7
Fleurs femelles	28,6							
" mâles	36,2							
" stériles et sommet inflor.	25,3							
Axe d'inflor. (partie dénudée)		11,1	3,3					6,7
Fruits verts, graines non mûres	3,5	3,4						
" " , péicarpes	21,4	11,1						
" rouges, graines non mûres		1,2						
" " , péicarpes		0						

L'examen du tableau fait ressortir :

- La très grande diversité des valeurs mésoxaliques des feuilles des espèces de la famille des Aracées (*Monstera deliciosa* 0 à *Arum maculatum* 30,5),
- Le comportement dissemblable d'espèces pourtant voisines : les propriétés décarboxylantes d'*Arum italicum* sont atténuées par rapport à celles d'*Arum maculatum*.
- L'existence d'une relation entre activité décarboxylante et pigmentation : la spathe d'*Acorus Calamus*, aussi chlorophyllienne que la feuille, a la même valeur mésoxalique ; celle d'*Arum maculatum*, blanc-verdâtre est moins active que le limbe ; enfin, la spathe de *Richardia ethiopica*, entièrement blanche, n'a presque pas d'activité, alors que la feuille est riche en catalyseur.

TABLEAU 74

Acéracées (*)	V. Mx (limbes)
<i>Acer campestre</i> L.	5,7
« <i>monspessulanum</i> L.	4,3
« <i>Negundo</i> L.	10,5
« « var. à feuilles panachées , feuilles vertes	13,4
« « « « « blanches	11,2
« « « « « panachées	15,7
« <i>platanoides</i> L.	6,5
« <i>Pseudo-Platanus</i> L. feuilles cotylédonaies	3,3
« « « primordiales	3,6
« « « normales	6,2
« <i>saccharinum</i> L.	2,8
« « var. <i>laciniatum</i> Pax.	7,9
« <i>tataricum</i> L.	4,5
(*) récolte le même jour en Juin	

Les propriétés décarboxylantes des *Acer* sont peu marquées dans l'ensemble ; seul *Acer Negundo* et sa variété panachée se distinguent par leurs activités nettement supérieures . Les résultats obtenus pour *Acer Pseudo-Platanus* montrent que la valeur mésoxalique est maximum dans les feuilles normales ✓

TABLEAU 75

Légumineuses	Epoque de la récolte (*)	V. Mx (limbes)
GENISTEES		
<i>Lupinus albus</i> L.	+	25,5
« <i>angustifolius</i> Ait.	+	22,1
« <i>luteus</i> L.	+	17,0
<i>Spartium junceum</i> L.	Fl.	14,5
<i>Cytisus Battandieri</i>	Fl.	15,8
TRIFOLIEES		
<i>Trigonella Faenum-graecum</i> L.	Fl. et Fr.	19,4
<i>Medicago maculata</i> Willd.	+	17,5
« <i>sativa</i> L.	Fl.	13,1
<i>Trifolium pratense</i> L., trèfle violet de Bretagne	Fl. et Fr.	2,0
« <i>repens</i> L.	Fl. et Fr.	12,1
« « , trèfle blanc S.100	Fl. et Fr.	10,8
« <i>hybridum</i> L., trèfle blanc-rose	Fl. et Fr.	5,4
« <i>alexandrinum</i> L.	+	0
LOTEES		
<i>Anthyllis Vulneraria</i> L.	Fl.	17,5
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Fl. et Fr.	12,0
GALEGEES		
<i>Amorpha fruticosa</i> L.	Fl.	6,5
<i>Galega officinalis</i> L.	Fl.	4,5
HEDYSAREES		
<i>Onobrychis sativa</i> Lmk.	Fl. et Fr.	9,1
VICIEES		
<i>Vicia Faba</i> L.	Fl. et Fr.	22,8
« <i>narbonensis</i> L.	Fl. et Fr.	10,1
« <i>sativa</i> L.	Fl.	19,9
<i>Ervum Lens</i> L., lentille d'Auvergne	+	23,8
<i>Lathyrus sativus</i> L.	Fl.	23,1
<i>Pisum sativum</i> L.	Fl.	24,3
PHASEOLEES		
<i>Soja hispida</i> Moench. var. Cayuga	+	5,2
« « « Hudson Manchû	+	15,1
« « « Tokio jaune à oeil brun	+	18,0
« « « brun hâtif Rouest	+	17,9
« « « 0,375 Kouban	+	10,4
« « « Vilnensis	+	16,2
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	+	15,8

(*) Fl. = en fleurs , Fr. = en fruits , + = non fleuri et non fructifié

Les valeurs mésoxaliques sont généralement élevées . L'examen du comportement des *Trifolium* fait apparaître les différences importantes qui existent entre les espèces du genre : *Trifolium alexandrinum* se distingue par son inactivité totale sur l'acide mésoxalique . De même , *Vicia narbonensis* se sépare de *Vicia Fabia* et de *Vicia sativa* ; par contre, pour les Lupins, les écarts observés ne sont pas aussi notables . Enfin, l'étude des *Soja* met en évidence à quel point les propriétés décarboxylantes peuvent différer avec les variétés .

Conclusions . -

Le nombre des espèces examinées pour chaque famille est trop restreint pour qu'il soit possible d'établir une relation entre leur activité décarboxylante et leur position systématique . Néanmoins, les observations faites sur les représentants de la famille des Aracées montrent que le comportement des genres peut être très différent . Enfin, on constate encore que les variétés d'une même espèce (*Avena sativa* , *Soja hispida*) ne présentent pas nécessairement des affinités d'ordre physiologique en ce qui concerne l'évolution des propriétés décarboxylantes .

÷
÷ ÷
÷

CHAPITRE VII

CONCLUSIONS

se

RAPPORTANT

aux

RECHERCHES D'ORDRE PHYSIOLOGIQUE

CONCLUSIONS SE RAPPORTANT AUX RECHERCHES

D'ORDRE PHYSIOLOGIQUE

Les graines, à l'état de repos, ne présentent jamais une valeur mésoxalique élevée.

Les propriétés décarboxylantes s'exaltent au moment de la germination et le phénomène n'apparaît pas surprenant à première vue. On sait, en effet, que les germinations sont des sources d'enzymes multiples qui, pour la plupart, requièrent des groupes sulfhydrylés libres pour leur activité, et que l'embryon est le siège de nombreuses divisions cellulaires où l'intervention de ces radicaux est déterminante (136, 71, 72, 63).

Sous quelle forme le catalyseur existe-t-il dans la jeune plantule ? La méthode utilisée, pour mesurer l'activité mésoxalique, ne permet pas de le préciser. Néanmoins, du glutathion a été isolé des jeunes germinations de pois par HOPKINS et MORGAN (81), ces auteurs ont, en outre, caractérisé de la cystéine et montré que la teneur en tripeptide, après avoir atteint rapidement un maximum, diminue ensuite. Si la présence du glutathion, au cours de la germination, ne paraît être que transitoire, il n'en est pas moins vrai, comme le prouve la détermination de la valeur mésoxalique, que des composés sulfhydrylés, quelle que soit leur nature, se rencontrent dans les organes en voie de croissance.

L'évolution des propriétés décarboxylantes se présente différemment pour les germinations développées à la lumière et pour celles obtenues à l'obscurité. Le calcul de l'activité, rapportée à cent plantules, rend compte, à la lumière, de l'apparition de nouveaux groupes thiols ou d'une augmentation de la réactivité de ceux existant primitivement dans la graine. Pour les germinations étiolées, on observe, au contraire, une diminution de l'activité, attribuable, soit à un changement dans la réactivité des groupes sulfhydrylés, soit à leur disparition ; cette dernière pourrait s'expliquer par la formation de ponts disulfures, par des réactions d'alkylation, et avoir son origine dans la réduction des processus anaboliques par suite d'un épuisement non compensé des réserves ternaïres⁽¹⁾. En résumé, on constate que l'activité décarboxylante est maximum pour les plantules placées dans les conditions permettant la photosynthèse et qu'elle est particulièrement marquée pour les feuilles.

Au cours du cycle de développement, on remarque encore, pour les organes végétatifs, que ce sont les feuilles ou les organes spécialisés dans les fonctions d'assimilation (cladodes, tiges assimilatrices) qui possèdent, en général, les valeurs mésoxaliques les plus élevées. La feuille étant l'organe essentiel de synthèse des protéines, il est logique d'attribuer à ses constituants protéiques, ainsi qu'au glutathion, une part importante de l'activité mésoxalique ; il convient de rappeler que les protéines des chloroplastes représentent 30 à 40 % des

(1) . Nos résultats sont donc inverses de ceux exposés par FIRKET et COMHAIRE (54) et selon lesquels les composés thiols disparaîtraient plus rapidement à la lumière qu'à l'obscurité. Le travail de FIRKET et COMHAIRE ne tient compte que des formes thiols solubles et le mode d'expression des résultats (rapportés à un poids sec et non à cent plantules) est défectueux.

En résumé, les données qu'apporte cette étude ne font qu'affirmer l'individualité physiologique des végétaux. L'activité mésoxalique élevée des organes foliaires plaiderait en faveur, soit d'une participation des groupes thiols à l'assimilation chlorophyllienne, soit d'une orientation particulière du métabolisme des composés sulfhydrylés régie par la photosynthèse.

Remarquons, enfin, que la présence du catalyseur chez les Champignons et dans les feuilles albini-sées tend à montrer que le métabolisme des composés thiols peut être tout à fait indépendant de l'assimilation chlorophyllienne.

÷
÷ ÷
÷

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

CONCLUSIONS GENERALES

Les résultats expérimentaux, que nous avons obtenus, ont été discutés au fur et à mesure de l'avancement de ce travail et les données acquises ont fait l'objet de conclusions partielles figurant à la fin de chaque chapitre ; aussi, ne ferons-nous que rappeler brièvement les faits essentiels de cette étude.

RESULTATS D'ORDRE BIOCHIMIQUE

L'acide mésoxalique, α -céto-di-acide, est décarboxylé par la levure et il apparaît des quantités stoechiométriques d'acide glyoxylique et d'anhydride carbonique :



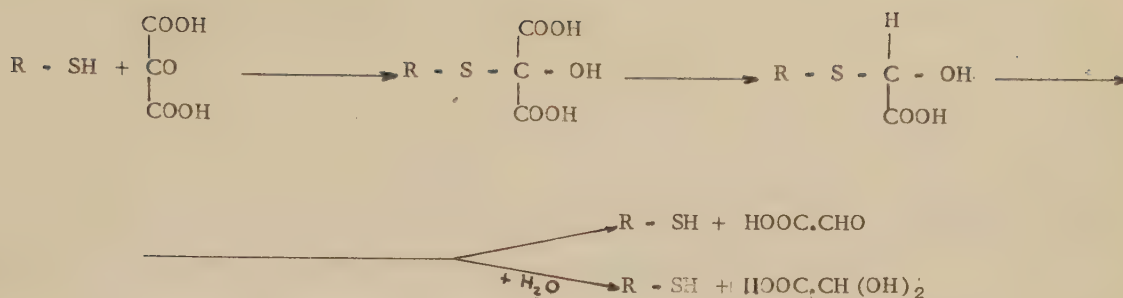
La décarboxylation ne peut être attribuée à la carboxylase de NEUBERG car le processus a lieu même après dénaturation par la chaleur et s'effectue dans une zone de pH différente de celle où se manifeste l'action de l'enzyme.

Les groupes thiols sont indispensables à la réalisation du phénomène, faut-il encore que le groupe carbonyle du cétoacide ne soit engagé dans aucune combinaison.

Des composés sulfhydrylés de bas poids moléculaire, d'origine biologique ou non, comme le glutathion, la cystéine, les acides thiomalique et thioglycolique, ... provoquent aussi la décarboxylation et seule, parmi les constituants du glutathion, la cystéine possède une action catalytique. Ces résultats, l'inhibition complète du processus par le chlorure mercurique, démontrent que les groupes thiols sont directement responsables du phénomène et font ressortir une nouvelle propriété de la fonction thiol : celle de catalyseur de décarboxylation.

L'acide thiomalique fournit l'exemple d'un modèle nouveau de carboxylase entièrement différent des modèles étudiés par LANGENBECK où le rôle catalytique est dévolu au groupe amino.

Les acquisitions précédentes permettent de donner un schéma satisfaisant du mécanisme de la décarboxylation :



En raison même de la simplicité de la catalyse qui ne nécessite l'intervention que du radical SH comme groupe actif, on conçoit qu'il ne peut y avoir un catalyseur spécifique de la décarboxylation, mais qu'il existera des systèmes décarboxylants variés pouvant comprendre, à la fois ou séparément, des thiols solubles et des thiols-protéines. Ainsi, les protéines de la levure ne sont pas seules à être douées de pouvoir décarboxylant; les préparations d'uréase de *Soja*, de papainase, d'édestine du chanvre et l'ovalbumine possèdent aussi un tel pouvoir.

La décarboxylation de l'acide mésoxalique par les thiols-protéines est activée par l'acide cyanhydrique; par ailleurs, cet acide présente un caractère décarboxylant non négligeable, ce qui lui confère une possibilité réactionnelle inconnue jusqu'alors,

Enfin, l'acide mésoxalique est un nouveau réactif sensible de la fonction thiol. Il présente, sur les réactifs habituels et sur ceux d'oxydation, en particulier, la propriété de ne mettre en jeu qu'un seul groupe thiol; il se comporte en ce sens comme l'acide p-chloromercuribenzoïque. A concentration moléculaire égale et pour une même valeur du pH, la réactivité des dérivés thiols s'avère différente; elle laisse entrevoir l'importance de la configuration moléculaire des composés actifs et l'interaction possible, dans le processus, des radicaux avoisinant le groupe thiol.

RESULTATS D'ORDRE PHYSIOLOGIQUE

La connaissance de la valeur mésoxalique permet d'apporter une contribution au problème de l'intervention des groupes thiols dans le métabolisme, qu'il s'agisse des thiols-protéines ou des thiols solubles.

Il existe une relation entre pigment chlorophyllien et activité décarboxylante. L'examen comparé de germinations obtenues à la lumière et à l'obscurité montre que les propriétés décarboxylantes d'organes homologues sont toujours plus accusées pour ceux se développant à la lumière. Le verdissement de plantules, préalablement développées à l'obscurité, conduit à une augmentation de l'activité, alors qu'un étiolement expérimental provoque le phénomène inverse. Le jaunissement des feuilles en fin de végétation entraîne également une disparition du caractère décarboxylant.

Cependant, la présence de chlorophylle dans un organe n'implique pas obligatoirement l'existence

de propriétés décarboxylantes, pas plus que son absence ne permet de conclure à la négation du pouvoir décarboxylant. Bien que chlorophylliennes, les feuilles de certaines Phanérogames terrestres possèdent des valeurs mésoxaliques nulles ou négligeables; c'est encore le cas des tiges feuillées des Mousses, des feuilles de Fougères et des feuilles submergées des plantes aquatiques examinées. Par ailleurs, la mise en évidence du catalyseur de décarboxylation chez les Champignons exclut l'idée d'une subordination stricte de l'activité décarboxylante à la présence de chlorophylle, et les valeurs mésoxaliques élevées des feuilles panachées ou atteintes d'albinisme, font ressortir l'individualité du comportement physiologique des végétaux.

Quoi qu'il en soit, la feuille paraît être l'organe végétatif dont les propriétés décarboxylantes sont accusées au maximum, et ceci nous amène à émettre l'hypothèse d'une relation entre activité mésoxalique et photosynthèse. Le simple examen de germinations obtenues à la lumière permet déjà de se rendre compte que l'activité mésoxalique se concentre dans les feuilles. L'étude comparée des propriétés décarboxylantes des différents organes végétatifs fait aussi ressortir la valeur mésoxalique élevée des limbes; en opposition, on constate que l'activité des organes de transport comme les tiges et les pétioles, d'absorption comme les racines, de multiplication végétative comme les rhizomes et les bulbes, reste toujours faible. On remarque encore que le catalyseur de décarboxylation se localise dans les organes qui jouent le rôle de feuilles (stipules), ou qui remplacent la feuille dans ses fonctions d'assimilation (cladodes, tiges assimilatrices).

L'étiollement a sur l'activité décarboxylante des répercussions différentes. Si l'étiollement précède le passage à l'état de vie latente du végétal ou s'il doit en entraîner la mort (feuilles automnales, étiollement provoqué par un séjour à l'obscurité), on observe que le caractère décarboxylant s'atténue ou disparaît complètement. Par contre, lorsque la plante présente normalement un phénomène d'albinisme, les propriétés mésoxaliques des feuilles achlorophylliennes ne sont pas obligatoirement modifiées. En fin de végétation, ces feuilles perdent, néanmoins, leur activité, ce qui montre que l'abolition des propriétés décarboxylantes est aussi en relation directe avec la protéolyse.

Les organes dont l'activité métabolique est intense sont généralement caractérisés par des valeurs mésoxaliques élevées. C'est le cas des feuilles, des jeunes plantules et des organes de reproduction. On note que la graine a une activité moindre que celle du jeune fruit et que ses propriétés décarboxylantes disparaissent lors de la maturation pour réapparaître à la germination.

La valeur mésoxalique n'est pas, en général, une donnée physiologique qui peut s'ajouter aux caractéristiques d'une espèce pour en préciser la définition. La valeur mésoxalique foliaire prise comme test de comparaison autorise difficilement une différenciation entre espèces d'un même genre. Sa connaissance fournit parfois des indications intéressantes; ainsi, *Acer Negundo* se distingue nettement des autres *Acer* par son activité décarboxylante très supérieure.

÷

÷ ÷

÷

BIBLIOGRAPHIE

	Pages
1. - ADAIR G.S.et ADAIR M.E., <i>Biochem.J.</i> , 28, 1934, 199.	78
2. - ALBERT R., BUCHNER E. et RAPP R., <i>Ber.</i> , 35, 1902, 2376.	90
3. - ARCHIBALD R.M., <i>J.Biol.Chem.</i> , 156, 1944, 121.	11
4. - ASTBURY W.T. et LOMAX R., <i>J.Chem.Soc.</i> , 138, 1935, 846.	78
5. - AUHAGEN E., <i>Z.physiol.Chem.</i> , 204, 1932, 149; 209, 1932, 20; <i>Biochem.Z.</i> , 258, 1933, 330.	2
6. - BALLOWITZ H. et MEIER R., <i>Z.physiol.Chem.</i> , 233, 1935, 204.	24
7. - BALLS A.K. et LINEWEAVER H., <i>J.Biol.Chem.</i> , 130, 1939, 669; <i>Nature</i> , 144, 1939, 513.	68
8. - BARRON E.S.G., <i>Adv.in Enzymology</i> , 11, 1951, 201.	48, 49, 68, 72, 90
9. - BARRON E.S.G. et SINGER T.P., <i>J.Biol.Chem.</i> , 157, 1945, 221.	48
10. - BASU K.P. et NATH M.C., <i>J.indian Chem.Soc.</i> , 13, 1936, 34.	71
11. - BAUR E., <i>Ber.</i> , 46, 1913, 856.	18
12. - BEHREND H. et PRUSSE A., <i>Liebigs Ann.</i> , 416, 1917-18, 239.	7
13. - BENNET E., <i>Plant Physiology</i> , 20, 1945, 461.	16
14. - BENSON A.A. et CALVIN M., <i>Ann.Rev.Plant Physiol.</i> , 1, 1950, 25.	2
15. - BERGMANN M., <i>Adv.in Enzymology</i> , 2, 1942, 61.	71, 78
16. - BERSIN T., <i>Z.physiol.Chem.</i> , 222, 1933, 177.	68
17. - BERSIN T., <i>Ergeb.Enzymforsch.</i> , 4, 1935, 82.	71
18. - BERSIN T., in BAMANN E. et MYRBACK K., <i>Die Methoden der Fermentforschung</i> , 1, 424, G.Thieme Ed., Leipzig, 1941; <i>Adv.in Enzymology</i> , 10, 1950, 294.	66
19. - BERSIN T., <i>Adv.in Enzymology</i> , 10, 1950, 223.	65
20. - BERSIN T., <i>Adv.in Enzymology</i> , 10, 1950, 301.	68
21. - BERSIN T. et LOGEMANN W., <i>Z.physiol.Chem.</i> , 220, 1933, 209.	71
22. - BINET L. et WELLER G., <i>Le glutathion</i> , Hermann et Cie Ed., Paris, 1937.	65
23. - BIRKINSHAW J.H., FINDLAY W.P.K. et WEBB R.A., <i>Biochem.J.</i> , 36, 1942, 526.	94
24. - BRUNEL A., <i>Bull.Soc.Chim.biol.</i> , 21, 1939, 388.	3, 20
25. - BRUNEL A., <i>Traité pratique de Chimie végétale</i> , I, 315, G.Frère Ed., 1948.	36
26. - BRUNEL A., <i>Traité pratique de Chimie végétale</i> , III, 524, G.Frère Ed., 1949	17
27. - BRUNEL A., <i>Traité pratique de Chimie végétale</i> , III, 621, G.Frère Ed., Tourcoing, 1949.	68
28. - BRUNEL-CAPELLE G., <i>C.R.Ac.Sc.</i> , 230, 1950, 1979 et 2024.	11
29. - BRUNEL-CAPELLE G., <i>C.R.Ac.Sc.</i> , 233, 1951, 1480.	20
30. - BRUNEL-CAPELLE G., <i>C.R.Ac.Sc.</i> , 233, 1951, 1658.	35
31. - BRUNEL-CAPELLE G., <i>C.R.Ac.Sc.</i> , 234, 1952, 1466.	4
32. - BRUNEL-CAPELLE G., <i>C.R.Ac.Sc.</i> , 236, 1953, 2162.	65
33. - BUNTING A.H. et JAMES W.O., <i>New Phytologist</i> , 40, 1941, 262.	2
34. - CAJORI F.A., <i>J.Biol.Chem.</i> , 143, 1942, 357.	2
35. - CALVIN M., BASSHAM J.A., BENSON A.A. et Aut., in Carbon fixation and Photosynthesis, <i>Symposia of the Soc.for Exp.Biology</i> N° 5, 1951, 284, Cambridge University Press.	2, 4
36. - CARSON S.F., RUBEN S., KAMEN M.D. et FOSTER J.W., <i>Proc.Natl.Acad.Sci.</i> , 27, 1941, 475.	2
37. - CAVALLINI D., <i>Biochem.J.</i> , 49, 1951, 1.	57, 62
38. - CHALLENGER F., SUBRAMANIAM V. et WALKER T.K., <i>J.Chem.Soc.</i> , 129, 1927, 200.	2
39. - COHEN P.P., <i>J.Biol.Chem.</i> , 164, 1946, 685.	2
40. - COHN E.J. et EDSALL J.T., <i>Proteins, Aminoacids and Peptides</i> , 348, Reinhold publishing Corporation, New-York, 1943.	68

41. - COMBES R., <i>Bull. Soc. Bot.</i> , 71, 1924, 43; <i>Rev. gén. Bot.</i> , 38-39, 1926, 430, 510, 563, 632, 673.	122
42. - COMBES R. et PINEY M., <i>C.R. Ac. Sc.</i> , 189, 1929, 942.	122
43. - CONN E.E. et VENNESLAND B., <i>Brookhaven Conf. Rept.</i> , BNL 70(C-13), 1950, 64.	1
44. - CONRAD M. et REINBACH H., <i>Ber.</i> , 35, 1902, 1813-19.	9
45. - CONWAY E.J. et MacDONNELL E., <i>Nature</i> , 156, 1945, 752.	2
46. - CUTHBERSON W.R. et PHILLIPPS H., <i>Biochem. J.</i> , 39, 1945, 7.	72
47. - DAVIES R., <i>Biochem. J.</i> , 37, 1943, 230.	2
48. - DAWSON E.R., <i>Biochem. J.</i> , 21, 1927, 398.	71
49. - DUBOS R.J. et THOMPSON R.H.S., <i>J. Biol. Chem.</i> , 124, 1938, 501.	77
50. - ECHEVIN R., <i>L'azote, le phosphore et le soufre chez les plantes ligneuses à feuilles caduques</i> , Thèse Doct. Sc., Paris, 1931.	116
51. - EEGRIVE E., <i>Z. anal. Chem.</i> , 100, 1935, 31.	18
52. - EPPINGER H., <i>Beitrag z. Chem. Physiol. u. Pathol.</i> , 6, 1904-05, 493; voir aussi II, 1908, 132.	18
53. - EULER H.v. et BOLIN I., <i>Z. physiol. Chem.</i> , 61, 1909, 1.	2
54. - FINK H. et KUHLES R., <i>Z. physiol. Chem.</i> , 218, 1933, 65.	94
55. - FIRKET M.J. et COMHAIRE, <i>Bull. Acad. roy. Méd. Belgique</i> , 9, 1929, 93.	106, 130
56. - FOSSE R. et Aut., <i>C.R. Ac. Sc.</i> , 193, 1931, 7; 197, 1933, 288; 204, 1937, 881; 205, 1937, 81 et 294; 207, 1938, 592 et 1021; 208, 1939, 826 et 1043; 211, 1940, 71.	11
57. - FOSSE R., BRUNEL A. et THOMAS P.E., <i>C.R. Ac. Sc.</i> , 192, 1931, 1615.	11
58. - FOSSE R., DE GRAEVE P. et THOMAS P.E., <i>C.R. Ac. Sc.</i> , 200, 1935, 1450.	18
59. - FOSSE R. et HIEULLE A., <i>C.R. Ac. Sc.</i> , 179, 1924, 637.	16
60. - FOSSE R., THOMAS P.E. et DE GRAEVE P., <i>C.R. Ac. Sc.</i> , 201, 1935, 105.	18
61. - FRUTON J.S. et BERGMANN M., <i>J. Biol. Chem.</i> , 133, 1940, 153.	71, 78
62. - GALSTON A.W., <i>Amer. J. Bot.</i> , 30, 1943, 331.	131
63. - <i>Glutathione, A symposium</i> , 1954, Academic Press Inc. Publishers, New York,	65, 130
64. - GOAS M., <i>C.R. Ac. Sc.</i> , 239, 1954, 989 et 1662.	116
65. - GODDARD D.R. et MEEUSE B.J.D., <i>Ann. Rev. Plant Physiol.</i> , 1, 1950, 207.	1
66. - GODDARD D.R. et MICHAELIS L., <i>J. Biol. Chem.</i> , 106, 1934, 605; 112, 1935, 361.	72
67. - GREEN D.E., HERBERT D. et SUBRAHMANYAN V., <i>J. Biol. Chem.</i> , 138, 1941, 327.	2
68. - GREENSTEIN J.P., <i>J. Biol. Chem.</i> , 125, 1938, 501.	77
69. - GREENSTEIN J.P., <i>J. Biol. Chem.</i> , 128, 1939, 233.	68
70. - HAARMAN W., <i>Biochem. Z.</i> , 314, 1943, 1.	52
71. - HAMMETT F.S., <i>Protoplasma</i> , 5, 1923, 535; 7, 1929, 297 et 535.	130
72. - HAMMETT F.S. et CHAPMAN S.S., <i>Growth</i> , II, 1938, 297.	130
73. - HANSON E.A., BARRIEN B.S. et WOOD J.G., <i>Austr. J. Exp. Biol. Med. Sc.</i> , 19, 1941, 231	131
74. - HELLERMAN L., <i>Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.</i> , 7, 1939, 165.	68
75. - HELLERMAN L., CHINARD F.P. et DEITZ V.R., <i>J. Biol. Chem.</i> , 147, 1943, 443.	68
76. - HERBERT D., <i>Symposia Soc. Exptl. Biol.</i> , 5, 1951, 52.	62
77. - HEVESY G., LINDERSTROM-LANG K., KESTON A.S. et OLSEN C., <i>C.R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. Chim.</i> , 23, 1940, 213.	106
78. - HEWITT E.J., <i>Ann. Rev. Plant Physiol.</i> , 2, 1951, 29.	62
79. - HIDY P.H., <i>J. Biol. Chem.</i> , 163, 1946, 307.	50
80. - HOET J.P. et DE MOOR P., in <i>Exp. Annuels Biochiméd.</i> , Masson et Cie Ed., Paris, 1951.	50
81. - HOPKINS F.G. et MORGAN E.J., <i>Nature</i> , 152, 1943, 288.	106, 130
82. - HOROWITZ N.H. et HEEGARD E., <i>J. Biol. Chem.</i> , 137, 1941, 475.	2
83. - HOUSSAY B.A., <i>Am. J. Med. Sci.</i> , 219, 1950, 353.	50
84. - IRVING J.W. Jr., FRUTON J.S. et BERGMANN M., <i>J. Biol. Chem.</i> , 139, 1941, 569.	71, 78
85. - IRVING J.W. Jr., FRUTON J.S. et BERGMANN M., <i>J. Gen. Physiol.</i> , 25, 1942, 669.	72

86. - JACOBS H.R., <i>Proc. Soc. exp. Biol. and Med.</i> , 37, 1937, 407.	50
87. - JONES W., <i>Am. J. Physiol.</i> , 52, 1920, 203.	77
88. - JORGENSEN A. et HANSEN A., <i>Microorganisms and Fermentation</i> , 136 et 223, Griffin and Co. Ltd., Londres, 1948.	94
89. - JUNI E., <i>Federation Proc.</i> , 9, 1950, 396.	2
90. - KLEIN G. et TAUBOCK K., <i>Biochem. Z.</i> , 241, 1931, 413.	16
91. - KOBAYASI S., <i>J. Biochem. Japan</i> , 33, 1941, 301.	2, 3
92. - KOLESNIKOV P.L., <i>Izvest. Akad. Nauk., S.S.S.R., Ser. biol.</i> , 1949, 281; <i>Dokl. Akad. Nauk., S.S.S.R.</i> , 71, 1950, 911.	4
93. - KORNBERG A., OCHOA S. et MEHLER A.H., <i>J. Biol. Chem.</i> , 174, 1948, 159.	3
94. - KRAMPITZ L.O. et WERKMAN C.H., <i>Biochem. J.</i> , 35, 1941, 595.	3
95. - KREBS H.A., <i>Biochem. J.</i> , 36, 1942, 303.	3
96. - KREBS H.A. et ROUGHTON F.J.W., <i>Biochem. J.</i> , 43, 1948, 550.	2
97. - KRETOVITCH V.L., BUNDEL A.A. et DROZDOVA T.B., <i>Biokhimiya</i> , 13, 1948, 332.	106
98. - KUBOWITZ F. et LUTTGENS W., <i>Biochem. Z.</i> , 307, 1941, 170.	2
99. - KUZIN A.M. et DOMAN N.G., <i>Doklady Akad. Nauk., S.S.S.R.</i> , 62, 1948, 255.	2
100. - LANGENBECK W., <i>Ergeb. d. Enzymforsch.</i> , 2, 1933, 314.	62
101. - LANGENBECK W. et HUTSCHENREUTER R., <i>Z. anorg. allg. Chem.</i> , 188, 1930, 1.	62
101bis LANGENBECK W., SCHAEFER O. et WREDE H., <i>Z. physiol. Chem.</i> , 221, 1933, 1.	62
102. - LATIES G.G., <i>Arch. Biochem.</i> , 19, 1948, 273.	33
103. - LAZAROW A., <i>Physiol. Revs.</i> , 29, 1949, 48.	50
104. - LEVI T.G., <i>Gazz. Chim. ital.</i> , 62, 1932, 775.	55
105. - LINDERSTROM-LANG K., HOTCHKISS D.R. et JOHANSEN D., <i>Nature</i> , 142, 1938, 996.	106
106. - LIPMANN F., <i>Nature</i> , 188, 1936, 1097.	62
107. - LIPPMANN E.O.v., <i>Ber.</i> , 46, 1913, 3862.	2
108. - LOHMANN K., in BAMANN E. et MYRBACK K., <i>Die Methoden der Fermentforschung</i> , III, 2557, G. Thieme Ed., Leipzig, 1941.	33
109. - LOHMANN K. et SCHUSTER P., <i>Biochem. Z.</i> , 294, 1937, 188.	2
110. - LYNEN F., <i>Liebigs Ann.</i> , 539, 1939, 1.	3
111. - MANN P.J.G. et QUASTEL J.H., <i>Biochem. J.</i> , 35, 1941, 502.	54
112. - MEE S., <i>Archiv. Biochem.</i> , 22, 1949, 139.	2
113. - MENDEL L.B. et BLOOD A.F., <i>J. Biol. Chem.</i> , 8, 1910, 177.	71
114. - MENKE W., <i>Z. f. Bot.</i> , 32, 1938, 273.	131
115. - MEYERHOF O. et KAPLAN A., <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 37, 1952, 375.	78
116. - MILLERD A., BONNER J., AXELROD B. et BANDURSKI R., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , 37, 1951, 855.	1
117. - MIRSKY A.E. et ANSON M.L., <i>J. Gen. Physiol.</i> , 18, 1935, 307.	77
118. - MOHRSCHULZE W., <i>Z. f. Elektrochem.</i> , 32, 1926, 434.	17
119. - MOLLIARD M., <i>Nutrition de la plante (cycle de l'azote) IV</i> , G. Doin Ed., Paris, 1925.	131
120. - MOLLIARD M., ECHEVIN R. et BRUNEL A., <i>C. R. Ac. Sc.</i> , 207, 1938, 1021.	131
121. - MORGAN E.J., <i>Nature</i> , 157, 1946, 512.	16
122. - MOYSE A., <i>La photosynthèse</i> , in <i>Année biologique</i> , 28, 1952, 224.	131
123. - NEUBAUER O. et FROMHERZ K.Z., <i>Z. physiol. Chem.</i> , 70, 1910-11, 326.	1
124. - NEUBERG C., in OPPENHEIMER C., <i>Die Fermente und ihre Wirkungen</i> , III, 1317 et suppl. N° 9, 1419, G. Thieme Ed., Leipzig, 1929.	2
125. - NEUBERG C. et KARCZAG L., <i>Biochem. Z.</i> , 36, 1911, 68.	1
126. - NEURATH H., GREENSTEIN P.J., PUTNAM F.W. et ERICKSON J.O., <i>Chem. Revs.</i> , 34, 1944, 157.	77
127. - NORD F.F., <i>J. Biol. Chem.</i> , 74, 1927, 58.	71

128. - NOSSAL P.M., *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, 27, 1949, 143. 3
129. - OCHOA S., *Physiol. Revs.*, 31, 1951, 56. 62
130. - OCHOA S., in SUMNER J.B. et MYRBACK K., *The Enzymes*, II, part. 2, 929, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1952. 1
131. - PATTERSON J.W. et LAZAROW A., *J. Biol. Chem.*, 177, 1949, 187. 50
132. - PERLZWEIG W.A., *Science*, 76, 1932, 435. 71
133. - POTTER V.R. et DUBOIS K.P., *J. Gen. Physiol.*, 26, 1943, 391. 54
134. - QUASTEL J.H. et WHEATLEY A.H.M., *Biochem. J.*, 25, 1931, 117. 54
135. - QUASTEL J.H. et WOOLDRIDGE W.R., *Biochem. J.*, 22, 1928, 689. 54
136. - RAPKINE L., *Ann. Physiol. Physicochim. biol.*, 9, 1931, 382. *J. Chim. phys.*, 34, 1937, 416. 130
137. - RATNER S. et CLARKE H.T., *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 1937, 200. 55
138. - ROTHEN A., *J. Gen. Physiol.*, 24, 1940, 203. 77
139. - SCHERMAN H.C. et WALKER F., *J. Am. Chem. Soc.*, 43, 1921, 2461; 45, 1923, 1960. 71
140. - SCHMIDT G. et LEVENE P.A., *J. Biol. Chem.*, 126, 1938, 423. 77
141. - SCHOBERL A. et LUDWIG E., *Ber.*, 70, 1937, 1422. 72
142. - SCHUBERT M.P., *J. Biol. Chem.*, 116, 1936, 437. 57
143. - SC' MITH E.L., in SUMNER J.B. et MYRBACK K., *The Enzymes*, I, part. 2, 853, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1951. 68
144. - SOUTOULOV A.N., *Compt. Acad. Sci., U.R.S.S.*, 53, 1946, 331. 106
145. - SPECK J.F., *J. Biol. Chem.*, 178, 1949, 315. 3, 48
146. - STEINBERGER R. et WESTHEIMER F.H., *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 1949, 4158; 73, 1951, 429. 62
147. - STERN K.G. et MELNICK J.L., *J. Biol. Chem.*, 131, 1939, 597. 62
148. - SUMIKI, *Bull. Agric. Chem. Soc., Japan*, 5, 1929, 27. 2
149. - SUMNER J.B., *J. Biol. Chem.*, 69, 1926, 435. 68
150. - SUMNER J.B., in SUMNER J.B. et MYRBACK K., *The Enzymes*, I, part. 2, 880, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1951. 69 77
151. - SUMNER J.B., in SUMNER J.B. et MYRBACK K., *The Enzymes*, I, part. 2, 882, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1951. 71
152. - SUMNER J.B., GRAMLEN N. et ERICKSON-QUENSEL B., *Science*, 87, 1938, 395. 68
153. - SUMNER J.B. et POLAND L.O., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 30, 1933, 553. 68 94
154. - SVEDERG T., *Tabulae Biologicae*, II, 1936, 351. 68
155. - TAUBER H., *J. Biol. Chem.*, 125, 1938, 191. 78
156. - TODRICK A. et WALKER E., *Biochem. J.*, 31, 1937, 292. 77
157. - TOLBERT N.E. et BURRIS R.H., *J. Biol. Chem.*, 186, 1950, 791. 4
158. - TOLBERT N.E., CLAGETT C.O. et BURRIS R.H., *J. Biol. Chem.*, 181, 1949, 905. 4
159. - TSCHELINZEFF W., *Bull. Soc. Chim.*, 37, 1927, 181. 4
160. - TURNER J.S. et HANLEY V., *Nature*, 160, 1947, 296. 33
161. - TYTELL A.A. et GOULD B.S., *J. Bact.*, 42, 1941, 513. 2
162. - UMBRETT W.W., BURRIS R.H. et STAUFFER J.F., *Manometric techniques and Tissue metabolism*, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1951. 17
163. - VENNESLAND B., *J. Biol. Chem.*, 178, 1949, 591. 3
164. - VENNESLAND B., in SUMNER J.B. et MYRBACK K., *The Enzymes*, II, part. 1, 183, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1951. 2 3 48
165. - VENNESLAND B. et FELSHER R.Z., *Arch. Biochem.*, II, 1946, 279. 2, 3
166. - VENNESLAND B., GOLLUB M.C. et SPECK J.F., *J. Biol. Chem.*, 178, 1949, 301. 3
167. - VINES S.H., *Ann. Botany*, 17, 1903, 602. 71
168. - WATT D. et KRAMPITZ L.O., *Federation Proc.*, 6, 1947, 301. 2
169. - WEIL-MALHERBE H., *Nature*, 145, 1940, 106. 62
170. - WERKMAN C.H. et WOOD H.G., *Adv. in Enzymology*, 2, 1942, 135. 1, 3

171. - WETZEL K., <i>Planta</i> , 15, 1932, 697.	2, 3, 20, 22, 47, 51
172. - WETZEL K. et RUHLAND W., <i>Planta</i> , 3, 1927, 765; 5, 1929, 503.	2
173. - WILDMAN S.G. et JAGENDORF A.T., <i>Ann. Rev. Plant. Physiol.</i> , 3, 1952, 131.	131
174. - WILISTATTER R. et GRASSMANN W., <i>Z. physiol. Chem.</i> , 138, 1924, 184.	73
175. - WOOD H.G. et WERKMAN C.H., <i>J. Bact.</i> 30, 1935, 232.	1
176. - ZELITCH I., <i>J. Biol. Chem.</i> , 201, 1953, 719.	4
177. - ZELITCH I. et OCHOA S., <i>J. Biol. Chem.</i> , 201, 1953, 718.	4

÷
÷ ÷
÷

INDEX DES NOMS BOTANIQUES

Bactéries et Algues

Micrococcus leisodeikticus, 3
Chara sp., 115

Champignons

Agaricus campester, 90, 94
Aspergillus niger, 2
Boletus elegans, 90
" *purpureus*, 90
" *scaber*, 90
Hypholoma fasciculare, 90
" *sublateritium*, 90
Mucidula mucida, 90
" *radicata*, 90
Panus stipticus, 90, 94
Saccharomyces cerevisiae, 51, 65, 90
Schizophyllum commune, 90, 94
Sterigmatocystis nigra, 3, 4

Bryophytes

Fontinalis antipyretica, 91, 94, 115
Funaria hygrometrica, 91, 95
Hynum triquetrum, 91
Leucobryum glaucum, 91
Polytrichum commune, 91
Sphagnum sp., 91, 94
Thuidium tamariscinum, 91

Pteridophytes

Osmunda regalis, 91
Polypodium vulgare, 91
Polystichum Filix-mas, 91
Salvinia natans, 91, 94, 115

Monocotyledones

Acorus Calamus, 91, 125
Aegilops triuncialis, 91, 124
Alisma natans, 91, 115
Anthurium sp., 125
Arum italicum, 125
" *maculatum*, 92, 95, 108, 109, 110, 112, 125, 131
Asparagus officinalis, 92, 95, 114
Avena sativa, 91, 124, 128

Calla palustris, 125
Colocasia esculenta, 125
Danae racemosus, 92, 114
Elodea canadensis, 91, 115
Hordeum sativum, 91, 124
Lemna minor, 92, 95, 115
Monstera deliciosa, 125
Potamogeton crispus, 91, 115
 " *natans*, 91, 115
Richardia ethiopica, 125
Ruscus aculeatus, 92, 114
Sagittaria sagittaeifolia, 91, 115
Secale cereale, 91, 124
Tradescantia sp., 2
Triticum compactum creticum, 124
 " *dicoccum*, 91, 124
 " *monococcum*, 124
 " *sphaerococcum*, 124
 turgidum lusitanicum, 124
 " *vulgare*, 124
Zea Mays, 91, 97, 98, 101, 124

Dicotyledones

Acer campestre, 93, 126
 " *monspessulanum*, 126
 " *Negundo*, 93, 117, 118, 122, 126, 131
 " " var. à feuilles panachées, 118, 122, 126, 131
 " *platanoides*, 93, 126
 " *Pseudo-Platanus*, 93, 126
 " *saccharinum*, 126
 " var. *laciniatum*, 126
 " *tataricum*, 126
Amorpha fruticosa, 127
Anthyllis vulneraria, 93, 127
Beta vulgaris, 2, 92
 " var. *Rapa*, 2
Betula verrucosa, 92
Brassica juncea, 92
 " *Napus* var. *Napobrassica*, 92
 " *Rapa*, 92
Callitriche vernalis, 93, 115
Canavalia ensiformis, 71, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 106
Cannabis sativa, 68, 92, 95, 97, 98, 109, 110
Carica Papaya, 68, 71
Cassia occidentalis, 99
Casuarina equisetifolia, 92, 114
Ceratophyllum demersum, 93, 115
Colletia spinosa, 93, 114
Cytisus Battandieri, 127

Desmanthus virgatus, 99
Enterolobium cyclocarpum, 20,99
Erum Lens, 93,127
Evonymus europaeus, 117,118,121
Fagopyrum tataricum, 92
Galega officinalis, 93,95,127
Juglans regia, 92,95,131
Lathyrus sativus, 127
Leucaena glauca, 99
Linum usitatissimum, 92,97,98,109,110,131
Lotus corniculatus, 93,127
Lupinus albus, 93,99,102,103,104,105,127
" *angustifolius*, 127
" *luteus*, 106,127
Medicago maculata, 127
" *sativa*, 2,127
Mimosa asperata, 99
" *pubica*, 99
Muhlenbeckia platyclada, 92,114
Nuphar luteum, 92,115
Onobrychis sativa, 127
Papaver somniferum, 92
Pelargonium zonale var. *Mme Salleron*, 117,118,121
Peltophorum ferrugineum, 99
Petroselinum sativum, 93,95
Phaseolus aureus, 1
" *vulgaris*, 93,127
Piper nigrum, 92,95
Pisum sativum, 93,95,99,109,110,127,131
Poinciana regia, 99
Ricinus communis, 93,95,109,110,131
Rumex Acetosa, 92
Soja hispida, 2,68,127,128
Solanum tuberosum, 93
Spartium junceum, 93,114,127
Spiraea Bumalda Anthony Waterer, 117,118,121
Trapa natans, 93,115
Trifolium alexandrinum, 127,128
" *hybridum*, 127
" *pratense*, 93,127
" *repens*, 127
Trigonella Faenum-graecum, 93,127
Vicia Faba, 93,127,128
" *narbonensis*, 127,128
" *sativa*, 127,128

- Table des matières -

	Pages
INTRODUCTION	1
PARTIE BIOCHIMIQUE	
CHAPITRE PREMIER	
Substrats, Préparation, Propriétés et Déterminations quantitatives	9
A.- ACIDE MESOXALIQUE	9
1.- Préparation	9
2.- Propriétés	10
3.- Détermination quantitative	11
a.- Par colorimétrie absolue de l'acide glyoxylique engendré par décarboxylation	11
b.- Par mesure manométrique de l'anhydride carbonique dégagé	17
B.- ACIDE GLYOXYLIQUE	17
1.- Préparation	17
2.- Propriétés	17
3.- Détermination quantitative	18
Chapitre II	
Présence chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> d'un catalyseur de décarboxylation de l'acide mésoxalique	20
A.- MISE EN EVIDENCE DU CATALYSEUR	20
B.- LOCALISATION DU CATALYSEUR	23
C.- IMPORTANCE DE LA REACTION DU MILIEU SUR LE PROCESSUS DE DECARBOXYLATION	24
D.- ACTION COMPAREE DES LEVURES HAUTE ET BASSE SUR LE MESOXALATE DE SODIUM ET SUR L'ACIDE MESOXALIQUE	26
E.- ETUDE COMPAREE DES PROPRIETES DECARBOXYLANTES DES FRACTIONS SOLUBLES ET INSOLUBLES OBTENUES A PARTIR DE LA LEVURE HAUTE	30
F.- CONCLUSIONS	33
Chapitre III	
Conditions expérimentales de la décarboxylation de l'acide mésoxalique	35
A.- DETERMINATION DU pH OPTIMUM D'ACTION	36
B.- INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LE PROCESSUS DE DECARBOXYLATION	38
C.- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT SUR LE PROCESSUS DE DECARBOXYLATION	40
D.- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CATALYSEUR SUR LE PROCESSUS DE DECARBOXYLATION	43
E.- MARCHE DU PROCESSUS DE DECARBOXYLATION EN FONCTION DU TEMPS	43
1.- Résultats obtenus par dosage colorimétrique de l'acide glyoxylique	43
2.- Résultats obtenus par dosage manométrique de l'anhydride carbonique à l'appareil de WARBURG	44

3.- Comparaison des valeurs respectives de la méthode de WARBURG et de la méthode à l'acide glyoxylique appliquées à l'étude du processus de décarboxylation de l'acide mésoxalique	47
F.- ETUDE DE L'ACTION DES EFFECTEURS	48
G.- CONCLUSIONS	51

Chapitre IV

Nature du groupe actif du catalyseur de décarboxylation et hypothèse sur le mécanisme d'action	54
A.- ETUDE DE L'ACTION DE QUELQUES DERIVES THIOLS SUR L'ACIDE MESOXALIQUE (glutathion, cystéine, acide thiomalique, ...)	54
B.- L'ACIDE THIOMALIQUE, MODELE DE CARBOXYLASE	57
1.- Détermination du pH optimum d'action	57
2.- Influence de la concentration en substrat sur le processus de décarboxylation	58
3.- Influence de la concentration en catalyseur sur le processus de décarboxylation	59
4.- Etude du processus de décarboxylation en fonction du temps	60
5.- Influence de la température	60
6.- Inhibition par le chlorure mercurique	61
C.- CONCLUSIONS	62

Chapitre V

Comportement du glutathion et de quelques thiols-protéines vis à vis de l'acide mésoxalique	65
A.- GLUTATHION	65
1.- Propriétés décarboxylantes en fonction du pH	65
2.- Propriétés décarboxylantes en fonction de la température	66
3.- Conclusions	67
B.- UREASE, PAPAINASE, EDESTINE	68
1.- Généralités	68
2.- Préparations d'uréase, de papainase et d'édestine	68
3.- Mise en évidence des propriétés décarboxylantes des thiols-protéines	69
4.- Action de composés susceptibles d'avoir un rôle activateur	71
a.- Essais d'activation par la cystéine et par le glutathion	72
b.- Essais d'activation par l'acide cyanhydrique	72
5.- Conclusions	76
C.- CONCLUSIONS	77

Chapitre VI

Conclusions se rapportant aux recherches d'ordre biochimique	80
--	----

PARTIE PHYSIOLOGIQUE

Chapitre I

Définition d'une unité d'activité et d'une valeur mésoxalique.	
Détermination de l'activité mésoxalique	85

Chapitre II

Aperçu des propriétés décarboxylantes des végétaux vis à vis de l'acide mésoxalique	90
---	----

Chapitre III

Evolution des propriétés décarboxylantes au cours de la germination	97
1.- Graines et jeunes germinations	97
a.- Germinations obtenues à la lumière et à l'obscurité	97
b.- Germinations d'espèces appartenant aux sous-familles des Légumineuses ...	99
2.- Valeurs mésoxaliques des organes séparés de germinations âgées de <i>Canavalia ensiformis</i>	99
3.- Répercussion de l'étiollement sur l'activité décarboxylante	101
4.- Activités comparées de germinations récoltées à différents stades de développement à la lumière et à l'obscurité	101
- Germinations à la lumière	102
- Germinations à l'obscurité	104
5.- Conclusions	106

Chapitre IV

Propriétés décarboxylantes des végétaux se développant dans leur milieu naturel	109
1.- Examen de quelques plantes terrestres à végétation annuelle et d' <i>Arum maculatum</i>	109
2.- Propriétés décarboxylantes des cladodes et des tiges assimilatrices	113
3.- Décarboxylation de l'acide mésoxalique par les végétaux aquatiques et semi-aquatiques	115
4.- Conclusions	116

Chapitre V

Propriétés décarboxylantes des feuilles panachées et achlorophylliennes	117
1.- <i>ACER NEGUNDO</i>	118
a.- Valeurs mésoxaliques	118
b.- Activités mésoxaliques rapportées à la surface foliaire	119
2.- <i>EVONYMUS EUROPAEUS</i> , <i>SPIRAEA BUMALDA</i> , <i>PELARGONIUM ZONALE</i>	121
3.- Conclusions	121

Chapitre VI

Etude comparée des propriétés décarboxylantes d'espèces appartenant à diverses familles	124
Graminées	124
Aracées	125
Acéracées	126
Légumineuses	127
Conclusions	128

Chapitre VII

Conclusions se rapportant aux recherches d'ordre physiologique	130
Conclusions générales	133
Bibliographie	137
Index des noms botaniques	142



DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté :

METABOLISME DE L'ACIDE GLYOXYLIQUE CHEZ LES ANIMAUX

Vu et approuvé :

Paris, le 21 Avril 1955

Le Doyen de la Faculté des Sciences :

J. PERES

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie

de Paris,

Jean SARRAILH

